

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO CÉSAR FERNANDES

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESPÉCIE *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker  
ASTERACEAE: CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, ANÁLISE  
FITOQUÍMICA, TOXICIDADE PRELIMINAR *IN VITRO* E PROPRIEDADES  
ANTIOXIDANTES

CURITIBA  
2018

FERNANDO CÉSAR FERNANDES

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESPÉCIE *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker  
ASTERACEAE: CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, ANÁLISE  
FITOQUÍMICA, TOXICIDADE PRELIMINAR *IN VITRO* E PROPRIEDADES  
ANTIOXIDANTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilis Dallarmi Miguel e Prof<sup>o</sup>. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA  
2018

Fernandes, Fernando César

Contribuição ao estudo da espécie *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker Asteraceae: caracterização morfoanatômica, análise fitoquímica, toxicidade preliminar *in vitro* e propriedades antioxidantes / Fernando César Fernandes – Curitiba, 2018.

77 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallami Miguel

Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Ácido clorogênico. 2. Ação antioxidante. 3. Asteraceae. I. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. II. Miguel, Marilis Dallami. III. Miguel, Obdulio Gomes. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 583.55

Maria da Conceição Kury da Silva – CRB – 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FERNANDO CÉSAR FERNANDES** intitulada: **CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESPÉCIE *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker, ASTERACEAE CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA, ANÁLISE FITOQUÍMICA, TOXICIDADE PRELIMINAR *IN VITRO* E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 19 de Fevereiro de 2018.

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN  
Avaliador Interno (UFPR)

VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIANDRADE)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois se não fosse da vontade dEle nada disso teria acontecido.

Aos meus pais, por todo o apoio que sempre me foi concedido.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A minha orientadora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Obdulio Gomes Miguel, por todo auxílio na realização prática de alguns ensaios e conhecimentos compartilhados.

A professora Dra. Cleusa Bona por ceder seu espaço e tempo para o estudo morfoanatômico da espécie.

Aos companheiros de laboratório, Aletheia Furusho, Filipe Horst, Isabel Mignoni, Jennifer Teixeira, Mariana Oshiro, Natasha Fabri e Yohans Martinez pela contribuição direta nesse trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

As demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

*“Seus feitos são seus monumentos”*

Inscrição em uma tumba egípcia

## RESUMO

Pertencente à família Asteraceae, a espécie *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker é uma planta endêmica do Brasil encontrada nas regiões Sul e Sudeste do país, sendo no estado do Paraná a espécie mais abundante do gênero. A escassez de estudos referente a espécie motivou o desenvolvimento desse trabalho, que teve por objetivo principal realizar estudo morfoanatômico, fitoquímico, de toxicidade preliminar *in vitro* e atividades antioxidantes do extrato e frações provenientes de partes aéreas da referida espécie. A caracterização morfológica foi realizada de acordo com metodologia padrão de microscopia óptica e eletrônica apresentando nas folhas e no caule tricomas e bolsas de óleo essencial, no caule a fitomelanina. As partes aéreas da planta foram utilizadas para o ensaio sistemático de análise fitoquímica elencando flavonoides, cumarinas, iridoides, aminogrupos e ácidos voláteis. O extrato bruto etanólico foi preparado por Soxhlet utilizando caules e folhas e os extratos obtidos foram fracionados com solventes de polaridade crescente para obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Os extratos e frações obtidos foram submetidos a doseamento de fenólicos totais; análise por CLAE/UV; ensaios de toxicologia preliminar *in vitro* pelo método *Artemia salina* L. e hemólise; ensaios de atividade antioxidante pelo complexo fosfomolibdênio e radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). Após avaliação dos resultados apresentados nos testes observou-se que a espécie *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker possui baixa toxicidade e promissora atividade antioxidante, com destaque para a fração acetato de etila que apresentou flavonoides na análise fitoquímica e ácido clorogênico por meio de análise CLAE/UV, tendo assim o melhor resultado frente aos ensaios realizados. O presente trabalho contribui para o conhecimento da espécie *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker referente a sua morfoanatomia, análise fitoquímica, toxicidade e propriedades antioxidantes, apresentando potencial para estudos futuros.

**Palavras-chave:** Ácido clorogênico. Atividade antioxidante. Fitomelanina.

Morfoanatomia. *Piptocarpha*.

## ABSTRACT

It belongs to the Asteraceae's family, the species *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker is an endemic plant of Brazil found in the South and Southeast regions of the country, being in the state of Paraná the most abundant species of the genus. The scarcity of studies related to the species motivated the development of this work, whose main objective was to perform a morphological, phytochemical, preliminary toxicity study *in vitro* and antioxidant activities of the extract and fractions from aerial parts of this species. The morphological characterization was performed according to standard methodology of optical and electron microscopy presenting in the leaves and in the stem trichomes and pockets of essential oil, in the stem phytomelanin. The aerial parts of the plant were used for the systematic phytochemical analysis of flavonoids, coumarins, iridoids, aminogroups and volatile acids. The crude ethanolic extract was prepared by Soxhlet using stems and leaves and the extracts obtained were fractionated with increasing polarity solvents to obtain the hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder fractions. The extracts and fractions obtained were submitted to assay of total phenolics; analysis by HPLC/UV; preliminary toxicological tests *in vitro* by the method *Artemia salina* L. and hemolysis; antioxidant activity assays by the phosphomolybdenum complex and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH •). After evaluation of the results presented in the tests, it was observed that the species *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker has low toxicity and promising antioxidant activity, especially the ethyl acetate fraction that presented flavonoids in the phytochemical and chlorogenic acid analysis through HPLC/UV, thus having the best result against the tests performed. The present work contributes to the knowledge of the species *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker referring to its morphology, phytochemical analysis, toxicity and antioxidant properties, presenting potential for future studies.

**Keywords:** Antioxidant activity. Chlorogenic acid. Morphoanatomy. Phytomelanin.

*Piptocarpha*.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURAS BASES QUÍMICAS PRESENTES EM ESPÉCIES VEGETAIS PERTENCENTES A FAMÍLIA ASTERACEAE. ....	11
FIGURA 2 - ESTRUTURAS SESQUITERPENICAS IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Piptocarpha</i> .....	15
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE NO BRASIL .....	17
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS REALIZADOS EM PARTES AÉREAS DE <i>P. axillaris</i> .....	18
FIGURA 5 - PARTES DE <i>P. axillaris</i> UTILIZADAS NO ESTUDO .....	19
FIGURA 6 - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>P. axillaris</i> .....	20
FIGURA 7 - PARTES DE <i>P. axillaris</i> UTILIZADAS NO ESTUDO MORFOANATÔMICO .....	37
FIGURA 8 - SECÇÕES TRANSVERSAIS DO CAULE DE <i>P. axillaris</i> .....	41
FIGURA 9 - SECÇÕES TRANSVERSAIS E MICROSCOPIA ELETÔNICA DE VARREDURA DE FOLHA DE <i>P. axillaris</i> .....	42
FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FOLHA) APRESENTANDO EM SEU PICO MAJORITÁRIO PERFIL SEMELHANTE AO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	49
FIGURA 11 - FORMAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO A PARTIR DO ÁCIDO QUÍNICO E ÁCIDO CAFEICO. ....	50
FIGURA 12 - RESULTADO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>P. axillaris</i> .....	53
FIGURA 13 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE <i>P. axillaris</i> PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA AOS PADRÕES .....	56
FIGURA 14 - RESULTADO DE $CI_{50}$ DAS AMOSTRA DE <i>P. axillaris</i> PARA REDUÇÃO DO DPPH•.....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS .....	43
TABELA 2 - RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E AQUOSO 20%.....	44
TABELA 3 - ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS DE CAULES E FOLHAS.....	46
TABELA 4 - RESÍDUO DAS FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DA ESPÉCIE <i>P. axillaris</i> .....	47
TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS, EXPRESSOS COMO EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO (EAG) POR G DE EXTRATO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DE <i>P. axillaris</i> .....	47
TABELA 6 - RESULTADO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DE <i>P. axillaris</i> . ....	54
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DE <i>P. axillaris</i> .....	55
TABELA 8 - RESULTADO DE $CI_{50}$ DAS AMOSTRA DE <i>P. axillaris</i> PARA REDUÇÃO DO DPPH•.....	58
TABELA 9 - EQUAÇÃO DA RETA PARA OS PADRÕES E AMOSTRAS PARA O CÁLCULO DE $CI_{50}$ DE AMOSTRAS DE <i>P. axillaris</i> PELO MÉTODO DO DPPH• .....	58

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>P. axillaris</i> .....	16
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	- Grau Celsius
µg	- Micrograma
BHT	- Butilhidróxidotolueno
CBA	- Chain breaking activity (atividade de quebra de cadeia)
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLAE/DAD	- Cromatografia líquida de alta eficiência com detector Diode Array
CL <sub>50</sub>	- Concentração letal 50%
DPPH•	- Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EB	- Extrato bruto
FAA	- Formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v)
FAE	- Fração acetato de etila
FC	- Fração clorofórmio
FH	- Fração hexano
FOH	- Fração remanescente
FRAP	- Eliminação de radicais e poder antioxidante de redução férrica
g	- Grama
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
MTT	- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NO	- Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
TAC	- Total antioxidant capacity (capacidade antioxidante total)
TBARS	- Thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico)
TFC	- Total flavonoid content (teor total de flavonoides)
TPC	- Total phenolic content (conteúdo fenólico total)

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	8
1.1	OBJETIVOS	9
1.1.1	OBJETIVO GERAL	9
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	10
2.1	FAMÍLIA ASTERACEAE	10
2.2	GÊNERO <i>Piptocarpha</i> R.Br. (Asteraceae: Vernonieae)	14
2.3	ESPÉCIE <i>Piptocarpha axillaris</i> (Less.) Baker	16
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	18
3.1	MATERIAL BOTÂNICO	19
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	21
3.3	DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO - UMIDADE	21
3.4	DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS	22
3.5	ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR	22
3.5.1	Preparo do extrato hidroalcoólico 20%	23
3.5.2	Pesquisa de flavonoides	23
3.5.3	Pesquisa de leucoantocianidinas	24
3.5.4	Pesquisa de alcaloides	24
3.5.5	Pesquisa de cumarinas	25
3.5.6	Pesquisa de substâncias iridoidais	25
3.5.7	Pesquisa de heterosídeo antraquinônico	26
3.5.8	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos	26
3.5.9	Preparo do extrato aquoso 20%	27
3.5.10	Pesquisa de heterosídeos antocianicos	27
3.5.11	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	28
3.5.12	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	28
3.5.13	Pesquisa de taninos	28
3.5.14	Pesquisa de aminogrupos	29
3.5.15	Pesquisa de ácidos fixos	29
3.5.16	Pesquisa de ácidos voláteis	30
3.6	PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	30
3.6.1	Extrato bruto etanólico	30

3.6.2	Determinação de teor de sólidos .....	30
3.6.3	Fracionamento dos extratos brutos etanólicos .....	31
3.7	DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	31
3.8	CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO. ....	32
3.9	TOXICIDADE PRELIMINAR <i>IN VITRO</i> .....	32
3.9.1	Avaliação da toxicidade com <i>Artemia salina</i> L.....	32
3.9.2	Atividade hemolítica.....	33
3.10	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	34
3.10.1	Redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	34
3.10.2	Formação do complexo fosfomolibdênio .....	35
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	37
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	37
4.2.1	Caule .....	38
4.2.2	Folha.....	39
4.3	PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS .....	43
4.4	ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	44
4.5	PREPARO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO.....	46
4.5.1	Obtenção do Extrato bruto etanólico e teor de sólidos .....	46
4.5.2	Resíduo das frações.....	47
4.6	DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	47
4.7	CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO .....	48
4.8	TOXICIDADE PRELIMINAR <i>IN VITRO</i> .....	51
4.8.1	Avaliação da toxicidade com <i>Artemia salina</i> L.....	51
4.8.2	Atividade hemolítica.....	51
4.9	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	54
4.9.1	Formação do complexo fosfomolibdênio .....	54
4.9.2	Redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	57
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
	<b>ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO</b> .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam substâncias químicas que podem ter efeitos medicinais, sendo estas uma fonte para obtenção de moléculas que podem ser exploradas para produção de medicamentos. (ZBIKOWSKA et al. 2016). Um exemplo clássico é a *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), popularmente conhecida por papoula, usada para a extração do ópio, no qual o componente majoritário é a morfina, usada no combate de dores intensas. Dessa referida planta também é possível isolar a codeína e a papaverina, utilizadas como analgésicos opioides. (FOGLIO et al., 2006).

Várias espécies vegetais da biodiversidade brasileira não possuem estudos científicos que permitam a elaboração de monografias completas, sendo estas usadas empiricamente. Desta forma, considera-se este um fator de incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos. (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; GUILARDUCCI et al., 2016).

Dentre as famílias que possuem substâncias terapêuticas validadas por estudos científicos encontra-se a família Asteraceae (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010), uma das maiores famílias de Angiospermas, com aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies presentes na flora brasileira. Sendo um desses, o gênero *Piptocarpha* R.Br. (Asteraceae: Vernonieae), presente majoritariamente no Sul e no Leste do Brasil, representado por nove espécies no estado do Paraná, nas quais está inclusa a *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker, uma espécie arbórea conhecida popularmente como cambará. (GROKOVISKI; CERVI; TARDIVO, 2009).

Devido à escassez de estudos desta espécie vegetal, esse trabalho visa contribuir para o estudo da referida planta, apresentando parte de sua morfoanatomia, análise fitoquímica, estudos de toxicidade preliminar *in vitro* e propriedades antioxidantes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo morfoanatômico, fitoquímico, de toxicidade preliminar *in vitro* e atividades antioxidantes do extrato e frações provenientes de partes aéreas de *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar a espécie;
- Realizar estudo morfoanatômico;
- Determinar teor de cinzas e umidade;
- Realizar ensaio sistemático de análise fitoquímica;
- Preparar extrato bruto etanólico;
- Fracionar o extrato bruto etanólico com solventes de diferentes polaridades;
- Realizar o doseamento de fenólicos totais;
- Realizar análise por CLAE/DAD;
- Avaliar toxicidade preliminar *in vitro*;
- Avaliar atividade antioxidante.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

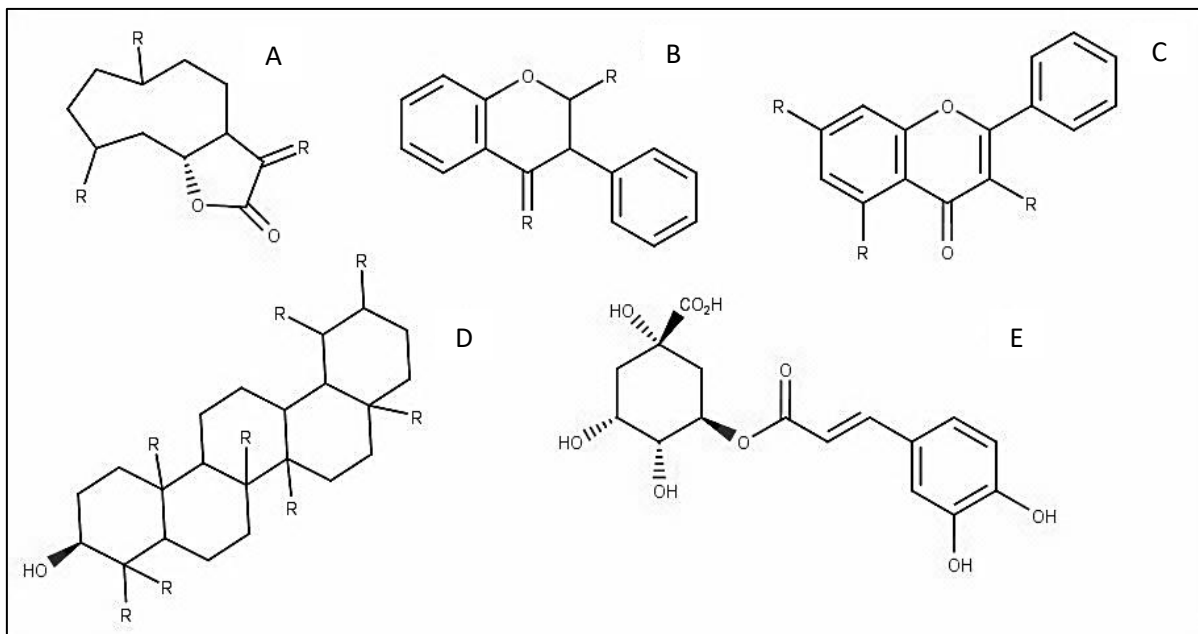
A família Asteraceae possui aproximadamente 1.600 gêneros e mais de 23.000 espécies, tendo 300 gêneros e 2.000 espécies presentes em território brasileiro. (SOUZA et al., 2013).

Estão inclusas espécies com finalidade medicinal, agrícola, industrial, entre outras. Algumas espécies foram domesticadas e cultivadas desde a antiguidade e outras fazem parte de áreas de vegetação natural. Aproximadamente 40 gêneros desta família são relevantes no que diz respeito a nutrição humana e animal, servindo como fontes de óleos fixos, óleos essenciais, forragem, mel e pólen, adoçantes, especiarias, corantes, inseticidas, borracha, madeira, lenha ou celulose. Também estão presentes na família metabólitos secundários usados na terapêutica. (VITTO; PETENATTI, 2009).

Espécies da família estão presentes em quase todos os continentes, exceto na Antártida e interior da Groenlândia. Ocupando diversos habitats, desde o nível do mar até elevadas altitudes, sua maior diversidade encontra-se em áreas tropicais, subtropicais e temperadas; abundantes em biomas como montanhas e em regiões áridas e semiáridas. (HASTON et al., 2007). No Brasil estão distribuídas nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e Pantanal. (BORGES et al., 2012).

A família é caracterizada pela presença de ácido clorogênico, isoflavonas, lactonas sesquiterpênicas, álcoois triterpenos pentacíclicos (FIGURA 1), óleos essenciais e derivados de acetileno. O que determina a utilidade ou aplicação das plantas é o acúmulo de certos metabólitos primários e secundários. Alguns flavonoides e óleos voláteis são comuns a quase todas as espécies (SEAMAN et al., 1990; BOHM; STUESSY, 2001) e dois grupos de substâncias são marcadores quimiotaxômicos da família, as lactonas sesquiterpênicas e os compostos poliacetilênicos.

FIGURA 1 - ESTRUTURAS BASES QUÍMICAS PRESENTES EM ESPÉCIES VEGETAIS PERTENCENTES A FAMÍLIA ASTERACEAE.



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A (estrutura base de lactonas sesquiterpênicas), B (estrutura base de isoflavonas), C (estrutura base de flavonoides), D (estrutura base de triterpenos pentacíclicos), E (ácido clorogênico).

NOTA: Elaborado através do programa MarvinSketch 17.28.0.

As sementes são as principais reservas de hidrocarbonetos como inulina, proteínas e lipídeos. (BRUNETON, 1995). Outra característica da família é a síntese de ciclitóis, especialmente L-inositol e o isômero esciloinositol. (BOHM; STUESSY, 2001; ANISZEWSKI, 2007).

Os óleos são ricos em ácidos graxos de cadeias curtas, especialmente linoleico e esteárico e em menor quantidade oleico, linolênico e palmítico. (VITTO; PETENATTI, 2009).

Encontram-se na família variadas espécies utilizadas na medicina popular em diversas regiões do Brasil. Dentre as quais podemos citar espécies com ação anti-inflamatória como a *Bidens pilosa* L., popularmente conhecida como “picão-preto” e *Lychnophora salicifolia* Mart conhecida popularmente como “arnicão”. Além de espécies com ações digestivas (*Vernonia condensata* Baker – boldo baiano), broncodilatadora e expectorante (*Mikania glomerata* Spreng – guaco). (ROBINSON, 1999; MATOS, 2009; GOUVEA, 2010).

As ações terapêuticas da família não são apenas de conhecimento popular, existem espécies com ações farmacológicas cientificamente comprovadas, dentre as ações mais citadas estão antimicrobiana (*Baccharis uncinella* DC), antioxidante (*Baccharis punctulata* DC), anti-inflamatória (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC), antiviral (*Baccharis trimera* (Less.) DC), antifúngica (*Baccharis articulata* (Lam.) DC) e antitumoral (*Taraxacum officinale* L.). (MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010).

Em um trabalho de Biavatti et al. (2007) onde realizou-se um levantamento etnofarmacognóstico em dois compêndios botânicos brasileiros de espécies da Mata Atlântica com potencial para produção de cosméticos, a família mais citada foi a Asteraceae com ações cicatrizante, tônica, aromática, adstringente, emoliente, antisséptica e despigmentante.

Fabri et al. (2011) avaliou o potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies da família Asteraceae. O extrato metanólico da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC apresentou significativa atividade antimicrobiana para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Cryptococcus neoformans* (CIM = 0,005; 0,005 e 0,039 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Os extratos metanólicos das folhas de *Bidens segetum* Mart. ex Colla e *Matricaria chamomilla* L. foram seletivos para *Shigella sonnei* e *P. aeruginosa* (CIM = 0,005 e 0,078 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Enquanto que o extrato metanólico das folhas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze e *Baccharis trimera* apresentaram atividade significativa apenas para *Candida albicans* (CIM = 0,039 mg mL<sup>-1</sup>), os extratos metanólicos das folhas de *Taraxacum officinale* foram ativos contra *C. albicans* e *C. neoformans* com CIM = 0,039 mg mL<sup>-1</sup>. Referente à atividade antioxidante frente ao DPPH•, os extratos metanólicos das folhas de *B. dracunculifolia*, *T. officinale* e das inflorescências de *B. segetum* apresentaram atividade com CI<sub>50</sub> de 5, 5 e 4 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nos extratos metanólicos das folhas das espécies vegetais estudadas foram identificados a presença de compostos como flavonoides, terpenos e outros que podem ser responsáveis pelas atividades observadas.

Referente a toxicidade de espécies da família Asteraceae, Silva, Overbeck e Soares (2014) realizaram um estudo nas pastagens do sul do Brasil, com arbustos de *Heterothalamus psiadioides* Less e *Baccharis patens* Baker. Neste estudo foram avaliados os efeitos fitotóxicos de *H. psiadioides* e *B. patens* e a variação sazonal. Os efeitos dos compostos orgânicos voláteis liberados diretamente das folhas frescas e secas das duas espécies foram avaliadas na germinação e no crescimento das plantas alvo alface e cebola, nas quatro estações. Os compostos voláteis de *H. psiadioides* e *B. patens* inibiram a taxa e velocidade de germinação e comprimento da raiz das plantas alvo, com folhas frescas apresentando maior fitotoxicidade. Esses parâmetros foram mais afetados por *H. psiadioides* do que por *B. patens* em todas as estações do ano, e ambas as plantas mostraram uma diminuição da fitotoxicidade no verão. Concluindo-se que ambos os arbustos possuem potencial alelopático, com *H. psiadioides* mostrando efeitos mais significativos.

Sytar et al. (2016) comparou o doseamento de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante de 26 espécies de plantas das famílias Asteraceae, Rosaceae e Lamiaceae conhecidas na Europa Central Oriental. Entre os extratos de folhas investigados, o conteúdo fenólico, de flavonoides e atividade antioxidante mais alta foram para as espécies *Stachys byzantine* L. (Lamiaceae), *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) e *Potentilla recta* L. (Rosaceae). O maior teor de ácido siríngico foi encontrado nos extratos de folhas de Asteraceae (0,782 a 5,078 mg g<sup>-1</sup> DW). O estudo comparativo mostrou diferença significativa de conteúdo de ácidos fenólicos nos extratos de folhas das diferentes famílias representadas.

Em um estudo mais recente, Anvari e Jamei (2017) avaliaram a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos presentes em extratos etanólicos de folhas e flores de algumas espécies de Asteraceae com o objetivo de descobrir o potencial antioxidante dessas, sendo elas *Artemisia absinthium* L., *Arctium lappa* L., *Silybum marianum* L., *Centaurea cyanus* L. e *Echinops ritro* L. No referido estudo os extratos das plantas foram obtidos por meio de método de extração absoluta para o conteúdo fenólico total (TPC), teor total de flavonoides (TFC), capacidade antioxidante total (TAC) e atividade de quebra de cadeia (CBA). Foram realizadas análises de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH•), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), eliminação de radicais e poder antioxidante de redução férrica (FRAP). Referente a

esses testes os resultados mostraram os valores mais altos para TPC, TBA, FRAP e DPPH• relacionados ao *A. absinthium*. Enquanto, o extrato de *A. lappa* mostrou o teor máximo de TFC, TAC, CBA e  $O_2^-$  radicais de eliminação. Além disso, os resultados indicaram que *E. ritro* é uma boa fonte de atividade de eliminação de radicais NO e  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ ). O estudo sugeriu que a flor apresentou melhores resultados que a folha.

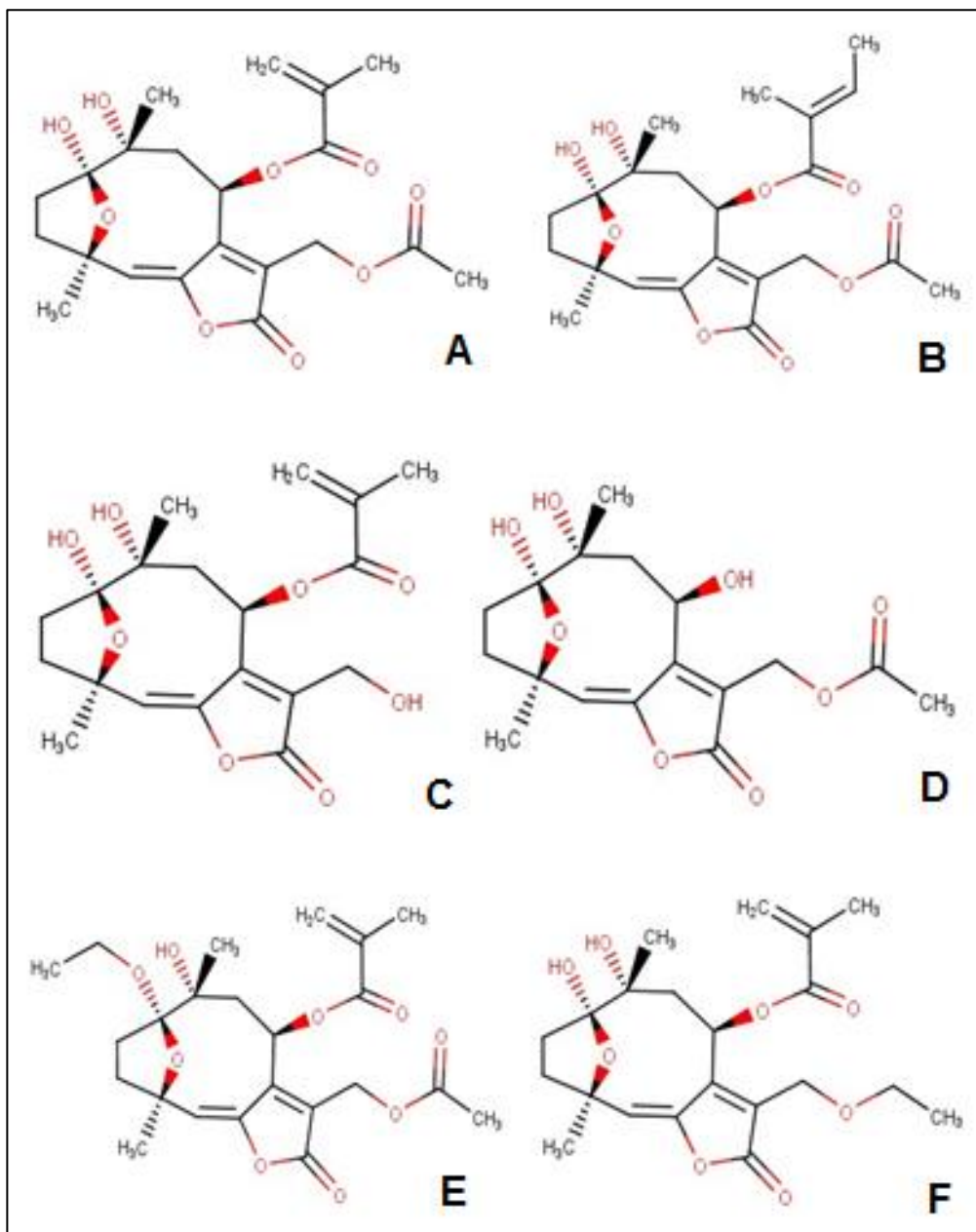
## 2.2 GÊNERO *Piptocarpha* R.Br. (Asteraceae: Vernonieae)

Pertencente à subtribo Piptocarphinae, tribo Vernonieae e subfamília Cichorioideae, este gênero neotropical possui cerca de 51 espécies estendendo-se do sul do Brasil e norte da Argentina para América Central. (ROBINSON, 2002).

Nas regiões Sul e Leste do Brasil está a maior concentração de *Piptocarpha* no país, com destaque para os planaltos do Sul referente a apresentação de maior distribuição de espécies arbóreas. (SMITH, 1981).

A espécie *Piptocarpha chantalensis* Pall apresenta seis lactonas sesquiterpênicas (piptocarphinas A – F) (FIGURA 2) derivadas do *piptocarphol* enquanto que na espécie *Piptocarpha oblonga* (Gardn.) Baker apresentam flavonoides e triterpenos, mas não possuem lactonas. (HERZ; KULANTHAIVEL, 1983). Também são descritos os seguintes metabólitos secundários para o gênero: alcaloides, esteróis, flavonoides e taninos. (SCIO et al., 2012). Sendo os triterpenos pentacíclicos e sesquiterpenos considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero. (PEREIRA, 2015).

Rodrigues et al. (2006), buscou atividade larvica contra *Aedes Aegypti* em 27 espécies vegetais do cerrado brasileiro. Dentre as espécies estudadas, três pertenciam a família Asteraceae das quais duas eram do gênero *Piptocarpha*, sendo elas *Piptocarpha macropoda* e *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker. Apenas o extrato etanólico de *P. rotundifolia* mostrou atividade contra as larvas do *Aedes Aegypti* com valor de  $CL_{50} = 162,31 \mu\text{g/mL}$ .

FIGURA 2 - ESTRUTURAS SESQUITERPENICAS IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Piptocarpha*

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A (piptocarphina A), B (piptocarphina B), C (piptocarphina C), D (piptocarphina D), E (piptocarphina E), F (piptocarphina F).

NOTA: Elaborado através do programa MarvinSketch 17.28.0.

O trabalho de Scio et al. (2012), teve como objetivo pesquisar atividade antioxidante e antimicrobiana em extratos de plantas de diversas famílias, onde foram estudadas 11 espécies da família Asteraceae. Dentre as espécies da referida família, a *P. macropoda* por meio de testes fitoquímicos qualitativos, evidenciou a presença de alcaloides, triterpenos, taninos e flavonoides. Referente a atividade antimicrobiana, o extrato metanólico de *P. macropoda* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 78 µg/mL para *Bacillis cereus*, 78 µg/mL para *Candida albicans* e 300 µg/mL para *Cryptococcus neoformans*.

Um estudo de Antinareli et al. (2015) mostrou que extratos metabólicos das folhas de *Piptocarpha macropoda* (DC.) Baker possuem uma promissora ação leishmanicida comparado à espécie vegetal *Casearia sylvestris*, espécie esta que apresentou o melhor resultado perante as outras dezesseis plantas de diferentes famílias também utilizadas no referido estudo.

### 2.3 ESPÉCIE *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker

O (QUADRO 1) apresenta informações referentes ao enquadramento taxonômico da espécie *P. axillaris*.

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *P. axillaris*

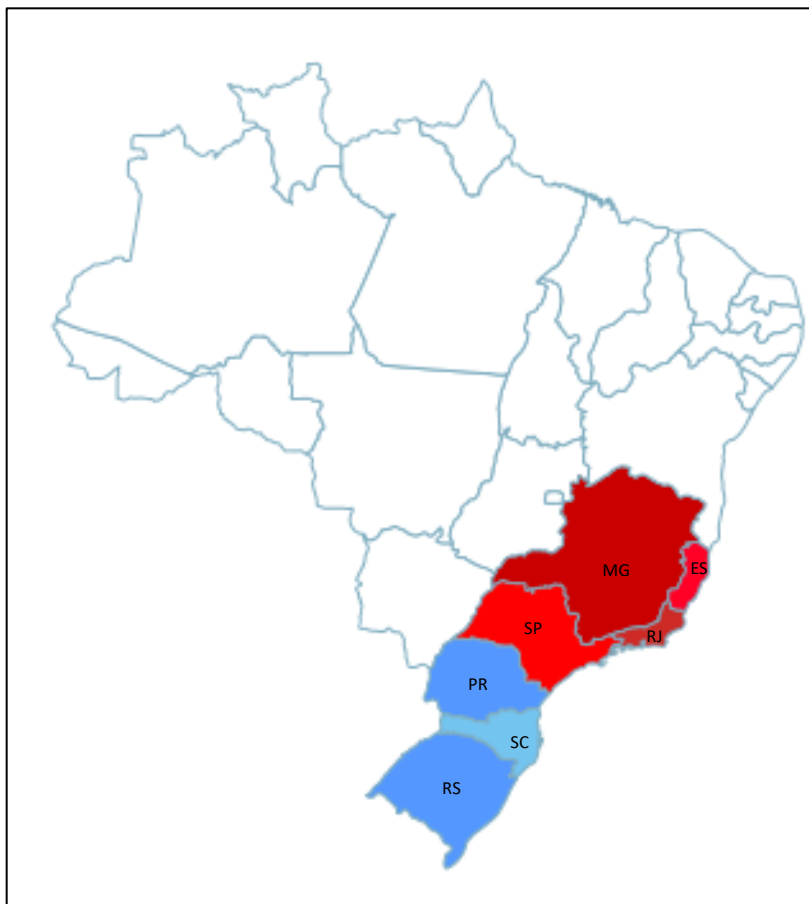
ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	
<b>Classe</b>	Equisetopsida C. Agardh
<b>Subclasse</b>	Magnoliidae Novák ex Takht.
<b>Superordem</b>	Asteranae Takht.
<b>Ordem</b>	Asterales Link
<b>Família</b>	Asteraceae
<b>Gênero</b>	<i>Piptocarpha</i> R. Br.
<b>Espécie</b>	<i>Piptocarpha axillaris</i> (Less) Baker

FONTE: Adaptado de Trópicos (2018).

De origem nativa, essa espécie é conhecida popularmente como Cambará. Apresentando os sinônimos *Carphobolus axillaris* (Less.) Sch. Bip., *Piptocarpha axillaris* var. *axillaris*, *Piptocarpha axillaris* subsp. *axillaris* e *Vernonia axillaris* Less (The Plant List, 2013).

Com uma altura que varia de 3 a 15 metros, a árvore floresce e frutifica entre os meses de julho a novembro, tendo sua madeira utilizada para a fabricação de caixarias na construção civil. Está presente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (FIGURA 3), sendo a espécie de *Piptocarpha* mais abundante no estado do Paraná. (GROKOVISKI; CERVI; TARDIVO, 2009).

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE NO BRASIL



FONTE: Re flora (2018).

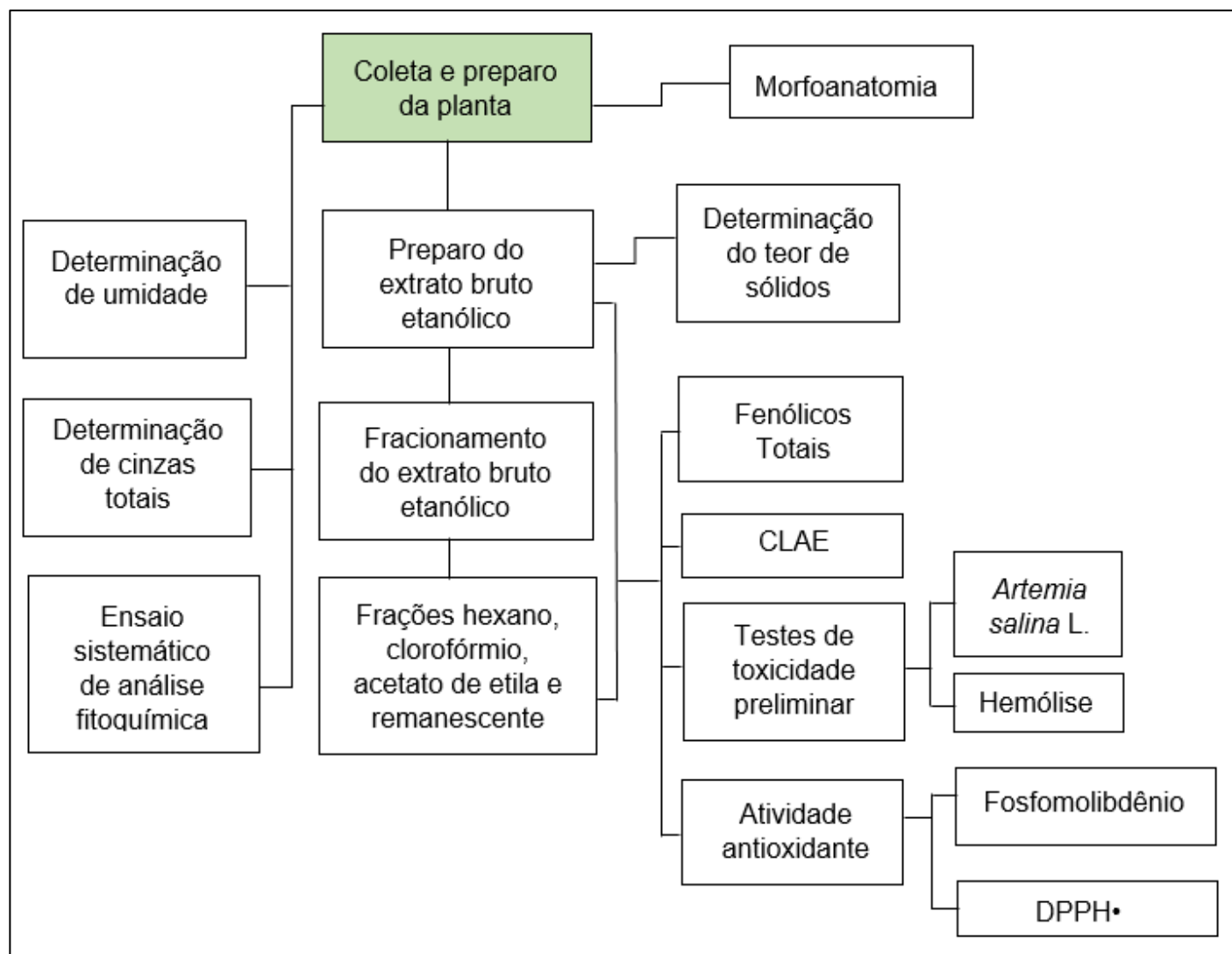
Pereira (2015) em seu trabalho descreveu o estudo fitoquímico das folhas da espécie *P. axillaris* que levou ao isolamento, identificação e determinação estrutural de 12 substâncias, sendo elas seis triterpenos, três esteroides e três flavonoides. No referido estudo também foram realizados ensaios biológicos de viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) frente à linhagem de células de linfoma histiocítico U937, mostrando atividade em pelo menos uma das concentrações ensaiadas.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A (FIGURA 4) apresenta o fluxograma com os procedimentos práticos que foram realizados nesse estudo.

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS REALIZADOS EM PARTES AÉREAS DE *P. axillaris*.



FONTE: O autor (2017)

### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de *Piptocarpha axillaris* (Less.) Baker foram coletadas nos meses de março e maio de 2016 para o preparo dos extratos e agosto de 2017 para realização do estudo morfoanatômico, no período da manhã, no Capão do Cifloma (Curitiba – PR), nas proximidades das coordenadas 25° 26'S e 49° 14'W.

As coletas foram realizadas pelo acadêmico do curso de Engenharia Florestal da UFPR, Rafael Rosenstock Voltz e encaminhada uma exsicata ao Museu Botânico de Curitiba para identificação pelo botânico José Tadeu Weidlich Motta. A exsicata foi depositada pelo próprio autor sob número MBM 201690 (FIGURA 6).

Foram coletados caules e folhas (FIGURA 5) deixados para secagem em local fresco e arejado e após esse processo, as amostras foram trituradas em moinho de facas e martelo.

A pesquisa da referida espécie vegetal, está autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por meio do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” constante no processo de nº 02001.001165/2013-47 (ANEXO 1).

FIGURA 5 - PARTES DE *P. axillaris* UTILIZADAS NO ESTUDO



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: A (caules), B (folhas) de *P. axillaris*.

FIGURA 6 - EXSICATA DA ESPÉCIE *P. axillaris*

FONTE: O autor (2017)

### 3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Para esse ensaio foram utilizadas partes aéreas da planta, tais como caules, limbos e pecíolos. O material vegetal foi fixado em solução de formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v) (FAA 70) (JOHANSEN, 1940) tendo como solução de estoque álcool etílico a 70% (v/v). (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

As lâminas semipermanentes foram confeccionadas segundo técnicas convencionais de corte à mão livre ou colocadas em polietilenoglicol e seccionadas em micrótomo de rotação. A coloração foi realizada com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) ou em dupla coloração com azul de astra e fucsina básica. (BRITO; ALQUINI, 1996). As lâminas foram montadas em gelatina glicerina (KAISER, 1880) e vedadas com esmalte incolor.

Os reativos empregados para os testes histoquímicos foram Sudan III para compostos lipofílicos (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940) e lugol para amido. (BERLYN; MIKSCHE, 1976). A análise e microscopia das plantas foram feitas em microscópio Olympus BX 41 com câmera digital SC 30.

Para análise em microscopia eletrônica de varredura essas amostras foram secas via ponto crítico de CO<sub>2</sub>, no aparelho Balzers CPC 10, aderidas em suporte metálico com fita adesiva de cobre e recobertas com ouro. Ambas as faces foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura marca JEOL JSM®, modelo 6360LV.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO - UMIDADE

A umidade das partes aéreas de *Piptocarpha axillaris* foi determinada por meio do método gravimétrico. (BRASIL, 2010). O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando amostras do caule e das folhas. O material vegetal foi submetido à temperatura de (100 -105)°C até observar-se peso constante, não diferindo por mais de 5 mg entre duas pesagens. O resultado foi representado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco, por meio da fórmula descrita a seguir:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde:

P<sub>u</sub> = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação.

P<sub>s</sub> = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

P<sub>a</sub> = peso da amostra.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

O ensaio para a determinação de cinzas totais foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira V edição (BRASIL, 2010), tendo como objetivo estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração. Foram utilizadas como amostras as partes aéreas de *Piptocarpha axillaris* divididas em caule e folhas. O material foi incinerado em mufla a 600°C durante 6 horas, até eliminação total do carvão, em triplicata. Após a incineração, os cadinhos foram esfriados em dessecador, seguidos da pesagem do resíduo presente e efetuados os cálculos em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original, por meio da formula apresentada abaixo.

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

Onde:

P<sub>1</sub> = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento.

P<sub>2</sub> = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador.

P<sub>3</sub> = Peso da amostra inicial.

### 3.5 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Foram realizados ensaios utilizando reações de coloração e/ou precipitação para mostrar as características qualitativas dos principais grupos químicos dos componentes ativos da droga vegetal.

O ensaio sistemático de análise fitoquímica foi realizado de acordo com Moreira (1979), com adaptações de Miguel (2003). Foram preparados extratos hidroalcoólico e aquoso 20% com o intuito de verificar a presença de flavonoides, leucoantocianidinas, alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, cumarinas, iridoides e

antraquinonas (hidroalcoólico) e compostos como heterosídeos antociânicos, saponínicos e cianogênicos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e voláteis (aquoso).

### 3.5.1 Preparo do extrato hidroalcoólico 20%

Foram pesados 40 g das partes aéreas da planta fragmentada e realizou-se uma maceração em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v) em banho-maria a 70° C por 1 hora. Após, o macerado foi filtrado em papel de filtro e lavado com o líquido extrator até completar o volume de 200 mL.

Assim, foi concentrado o extrato hidroalcoólico até adquirir 1/3 do seu volume para retirar o excesso de álcool etílico, sendo posteriormente colocado o extrato em um funil de separação para dar início ao fracionamento. O extrato obtido foi fracionado com solventes de polaridade crescente, hexano, clorofórmio e acetato de etila.

Foram adicionados 20 mL do primeiro solvente (hexano) separando-os, após agitação, a fração dissolvida no mesmo. Esse procedimento foi repetido por 10 vezes. O fracionamento foi realizado com os demais solventes até chegar a quatro frações de 200 mL, denominadas hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Essas frações permaneceram refrigeradas (2–8)°C durante a realização de todos os ensaios, as quais serviram para orientar por solubilidade, os grupos químicos a serem pesquisados.

### 3.5.2 Pesquisa de flavonoides

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido, como na reação de Schinoda ou cianidina, com HCl concentrado e magnésio em pó. Com essa reação pode-se caracterizar compostos contendo um núcleo  $\alpha$ -benzopirona, pelo desenvolvimento de cor laranja a vermelha.

Foram levadas à secura em banho-maria 20 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para a fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar. Foram adicionados 10 mL de etanol absoluto nas cápsulas com resíduo seco transferindo 5 mL para cada tubo de ensaio, inclusive 5 mL da fração hidroalcoólica. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta

pesquisa foi realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de b quer com gelo, dentro da capela).

A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavonas com coloração amarela a vermelho; flavonol e diidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas, isoflavononas e flavononas não apresentam coloração.

### 3.5.3 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foi transferido para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e levada à secura, sendo que não houve necessidade de secar a fração hidroalcoólica. O resíduo nas cápsulas foi dissolvido com 5 mL de álcool etílico absoluto, e adicionado 5 gotas de HCl concentrado, aquecendo até ebulição.

Na reação positiva é observado o desenvolvimento de coloração vermelha.

### 3.5.4 Pesquisa de alcaloides

Esta técnica é baseada na capacidade que os alcaloides possuem quando em estado de sal (extratos ácidos), combinar-se com o iodo e metais pesados (bismuto, mercúrio, tungst nio) formando precipitados.

Para esta pesquisa foram utilizados os reativos gerais para alcaloides, Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio) e Bouchardart (iodo-iodeto de potássio).

Foi levado à secura 25 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, em banho-maria a 70 C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol absoluto e 10 mL de ácido clorídrico a 1%. Foram transferidos 2 mL do extrato clorídrico para 5 tubos de ensaio e adicionado em cada tubo duas gotas dos reativos gerais para alcaloides, mantendo o quinto tubo como branco.

O aparecimento de precipitado indica reação positiva, sendo este precipitado branco para o reativo de Mayer, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.



### 3.5.5 Pesquisa de cumarinas

Esta pesquisa baseia-se na conversão do ácido hidroxicinâmico em sal alcalino fluorescente, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e consequente formação do ácido hidroxicinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos, sob luz ultravioleta (UV) em 366 nm.

Para que fosse possível detectar a presença de cumarinas nas frações, foram marcados com grafite (lápiz), em um papel de filtro, três pontos e sobre eles pingou-se as frações formando manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro.

As manchas 1 e 2 foram tratadas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e, sobre a mancha 1, foi colocada uma moeda, depois levou-se o papel filtro à câmara de ultravioleta a 366 nm, deixando em exposição por 15 minutos. A reação é considerada positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

### 3.5.6 Pesquisa de substâncias iridoidais

Foi transferido para cada tubo de ensaio 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, adicionando pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 mL de HCl. Em reação positiva observa-se o aparecimento de uma coloração verde escura.

Após, foi transferido para cada tubo de ensaio 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, adicionando duas gotas de ácido sulfúrico. Em reação positiva observa-se o aparecimento de uma coloração rosa violáceo.

Em seguida transferiu-se para cada tubo de ensaio 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, adicionando cristais de vanilina ou 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 1% e duas gotas de ácido sulfúrico. Em reação positiva há presença de coloração rosa cereja.



### 3.5.7 Pesquisa de heterosídeo antraquinônico

Foram separados 30 mL de cada fração, adicionados 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %, colocados em balões acoplados a condensador e levados a refluxo por 30 minutos. Após, o processo de filtração em papel filtro foi realizado ainda a quente, adicionando-se ao filtrado 30 mL de água destilada. Com um funil de separação, foi obtida as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração hidroalcoólica foi extraída com 10 mL de éter etílico por duas vezes.

As frações foram concentradas até aproximadamente 5 mL e transferidas para um tubo de ensaio, efetuando-se a reação de Bornträger, na qual adicionou-se 5 mL de hidróxido de amônia, agitando lentamente.

O aparecimento de coloração avermelhada indica a presença de antraquinonas e/ ou naftoquinonas.

### 3.5.8 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

Foram evaporados 15 mL de cada fração em banho-maria e, com o auxílio de um bastão seco, foram dissolvidos com clorofórmio e filtrados. Em seguida, foram pipetados 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico de cada fração para 3 tubos de ensaio, completando-os para o volume de 2 mL com clorofórmio. Foi realizada a reação de Libermann Bouchard, em capela, adicionando-se 1,0 mL de anidrido acético e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente.

O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul é um indicativo da presença da função carbonila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Enquanto que a coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Quando ocorre o desenvolvimento de coloração amarela, possivelmente existe a presença de metila em C<sub>14</sub>.

#### 3.5.8.1 Reação de Keller Kelliani

Foram transferidos para 4 tubos de ensaio 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, e hidroalcoólica, em seguida, foram levadas à secura. Após, o resíduo foi dissolvido com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. A mistura foi transferida cautelosamente para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos ou na fase acética indica reação para desoxi açúcares. A coloração azul indica a presença de esteroides, enquanto a coloração verde indica a presença de triterpeno.

#### 3.5.9 Preparo do extrato aquoso 20%

Foram utilizados 40 g de material vegetal e 200 mL de água destilada para o processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora. Decorrido esse tempo, foi retirado o frasco do banho-maria, filtrado o extrato e o volume completado até 200 mL com o líquido extrator, lavando o material.

#### 3.5.10 Pesquisa de heterosídeos antocianicos

Para realização deste ensaio, foram transferidos 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidificando o primeiro tubo com ácido clorídrico 0,1 M (pH aproximadamente 4), alcalinizando o segundo tubo com hidróxido de amônio 1 M (pH aproximadamente 10) e neutralizando o terceiro tubo com ácido clorídrico 0,1 M ou hidróxido de amônio 0,1 M de acordo com a necessidade (pH 7).

O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violáceo em meio neutro, indica reação positiva. A coloração verde indica flavonoides.

### 3.5.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Foram agitados energicamente com movimentos sucussionais por cinco minutos os tubos da pesquisa de heterosídeos antocianicos, deixando-os em repouso por trinta minutos. Após agitação e decorridos trinta minutos, foi medida a altura do anel de espuma formado.

O desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso indica reação positiva.

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com consequente formação de espuma mediante agitação. (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

### 3.5.12 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Para este ensaio foi utilizada a reação de Schoembein, onde 5 mL do extrato foram colocados em uma cápsula de porcelana e adicionados quatro gotas de hidróxido de potássio (KOH) a 10%, três cristais de sulfato ferroso e mais uma gota de cloreto de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ) 1%.

Em seguida o extrato foi aquecido em chapa de aquecimento até ebulição, juntou-se uma gota de HCl concentrado. O desenvolvimento de coloração azul da Prússia, indica a presença de heterosídeo pela formação de cianeto férrico.

### 3.5.13 Pesquisa de taninos

Para a pesquisa de taninos foram realizados dois ensaios, o primeiro foi o do cloreto férrico onde adicionou-se de três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1 mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul, para flavonoides verde, e para polifenóis marrom.

O segundo ensaio foi realizado com solução de gelatina, onde foram transferidos para três tubos de ensaio 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL do extrato aquoso e adicionados em cada tubo 2 mL de solução de gelatina a 2,5% recém preparada em água.

O desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.

### 3.5.14 Pesquisa de aminogrupos

Com auxílio de um condensador de bolas e temperatura de 60°C, foram concentrados 10 mL de extrato aquoso até 5 mL. Em tira de papel de filtro, foram adicionadas cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, foi nebulizado no papel de filtro uma solução de ninhidrina 0,1% e o papel levado à estufa na temperatura de 100° C durante quinze minutos. A reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

### 3.5.15 Pesquisa de ácidos fixos

Foram transferidos 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N para um balão de fundo chato com 100 mL de capacidade, acoplando-se a ele um condensador de bolas e levando-o a refluxo durante trinta minutos. Decorrido o tempo, foi esfriado e acidificado o extrato alcalino com 2 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e extraído com auxílio de um funil de separação, com 10 mL de éter etílico por três vezes.

Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C. O resíduo foi aquecido em estufa à 100°C por dez minutos, esfriado, adicionado 5 mL de solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH 1N e filtrado. Foram adicionadas três gotas do filtrado anterior a um papel de filtro em três pontos previamente marcados com grafite. No primeiro ponto foi pingado uma gota do extrato amoniacal. No segundo ponto foi pingado o uma gota do extrato amoniacal mais uma gota do reativo de Nessler e no terceiro ponto foi pingado apenas uma gota do reativo de Nessler. O desenvolvimento de coloração no ponto 2 diferente do 1 e 3 indica presença de ácidos fixos.

### 3.5.16 Pesquisa de ácidos voláteis

Foi transferido para um tubo de ensaio 5 mL do extrato aquoso e 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com cuidado para não umedecer as paredes do tubo. Em seguida suspendeu-se uma tira de papel indicador de pH (0 a 14) com auxílio de uma rolha de cortiça, evitando que o papel tocasse no extrato. Os tubos de ensaio foram levados para banho maria a 60°C durante trinta minutos.

O aparecimento de coloração avermelhada, indica a presença de ácidos voláteis.

## 3.6 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

### 3.6.1 Extrato bruto etanólico

O extrato bruto dos caules e folhas foi preparado separadamente, utilizando aproximadamente 4000 gramas de caules e 1000 gramas de folhas em aparelho de Soxhlet (CARVALHO et al. 2009), como solvente extrator foram utilizados 8 litros de álcool etílico absoluto 96% (v/v) (PA) para os caules e 6 litros para as folhas até esgotamento total.

Terminada as extrações, o material foi filtrado e concentrado até aproximadamente 1/3 em evaporador rotatório até adquirir aspecto de extrato fluido.

### 3.6.2 Determinação de teor de sólidos

Para esta determinação, foi depositado 1 mL do extrato bruto etanólico em placa de petri, previamente seca e tarada. Em seguida, foi levada à estufa a 100° C até peso constante e então procedido os cálculos onde o resultado foi apresentado em quantidade de sólidos em porcentagem em relação a massa do material vegetal seco coletado. O ensaio foi realizado em triplicata. (BRASIL, 2010).

### 3.6.3 Fracionamento dos extratos brutos etanólicos

O extrato bruto etanólico do caule e da folha foram fracionados separadamente, por meio de fracionamento líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado, com solventes de polaridade crescente (CARVALHO, 2001). Foram obtidas as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente de caules e folhas designadas como FHC (fração hexano caule), FHF (fração hexano folha), FCC (fração clorofórmio caule), FCF (fração clorofórmio folha), FAEC (fração acetato de etila caule), FAEF (fração acetato de etila folha), FOHC (fração remanescente caule) e FOHF (fração remanescente folha).

O sistema de extração por aparelho de Soxhlet modificado faz uso da auto-renovação do solvente utilizado e encontra-se sob patente de modelo industrial no INPI sob o nº 0601703-7 A2. (MIGUEL et al., 2007).

### 3.7 DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS

Para determinação do teor de fenólicos totais utilizou-se o método proposto por Slinkard e Singleton (1977), onde os extratos brutos e frações de caules e folhas foram diluídos em metanol ( $1000 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e adicionados 0,32 mL ao tubo de ensaio, completado para 3,4 mL com água destilada, após total solubilização foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu 2N (Alphatec®), novamente homogeneizado e adicionado 0,4 mL da solução de carbonato de sódio a 10%, agitado e deixado em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 760 nm utilizando curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  como padrão. O ensaio foi realizado em triplicata. Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas equivalente de ácido gálico (EG) por grama de extrato bruto, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração:  $y=0,0392x-0,0583$ .

Os valores foram submetidos ao programa estatístico Assistat 7.7 utilizando o teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO.

Após a obtenção da fração acetato de etila (folha) foi realizada uma coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária uma pastilha de sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200mm) e como fase móvel a mistura dos solventes acetato de etila e hexano, inicialmente partindo-se de 70% até 100% acetato de etila. As misturas foram realizadas utilizando um volume máximo de 100 mL, aumentando-se o gradiente de polaridade de 5 em 5 mL. No final desse processo, foram utilizados 50 mL de metanol para extrair compostos de maior polaridade.

As frações obtidas foram coletadas em frascos e realizada cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como sistema eluente acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26). Como revelador utilizou-se reativo de NEU (difetilboriloxietilamina 1% em metanol) com leitura em UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm.

Após CCD as amostras foram agrupadas de acordo com os compostos visualizados no UV e analisados em CLAE/UV. (SIMÕES et. al., 2007).

Para análise em CLAE/UV o resíduo (metanol) obtido da fração acetato de etila foi diluído em MeOH a concentração de 50 mg/mL e submetido à análise por CLAE Merck Hitachi – Elite Lachrom, com detector diodo (DAD) em 328 nm, coluna XTerra® RP18 5 µm, 4,6 x 250 mm, volume de injeção de 20 µL, fluxo 1,00 mL/min. Como fase móvel foi utilizado gradiente de concentração o sistema H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-40 min, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O MeOH utilizado foi grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ. (OLIVEIRA, et al., 2016).

### 3.9 TOXICIDADE PRELIMINAR *IN VITRO*

#### 3.9.1 Avaliação da toxicidade com *Artemia salina* L.

Foram adquiridos os ovos do microcrustáceo da espécie *Artemia salina* L. e procedido o preparo do ensaio conforme metodologia citada por Meyer et al. (1982).

Os ovos foram eclodidos em água salina, preparada com 14,31 g de sal marinho e dissolvidos em 400 mL de água purificada. Para esta quantidade, foram adicionados 200 mg dos ovos do crustáceo. A temperatura foi controlada entre (27 –

30)°C e a solução mantida sob agitação e aeração constante por 48 horas. Nas primeiras horas do processo foi mantida iluminação (20 W) sobre o recipiente, devido ao fototropismo dos náuplios.

Foi preparada uma solução com os extratos e respectivas frações de caules e folhas em concentrações de 1000, 100 e 10 µL/mL, todas em triplicata.

Os frascos com as soluções foram colocados em estufa para total eliminação do solvente (metanol), inclusive a do controle negativo que utilizou apenas o solvente utilizado na dissolução das amostras e a do controle positivo quinidina. Após a evaporação das soluções, os crustáceos foram adicionados ao frasco com a ajuda de conta gotas de vidro, totalizando 10 em cada frasco. Foi adicionada 10 mL de solução salina para acomodar e visualizar os crustáceos.

Após 24 horas foram observados o número de náuplios mortos na presença das concentrações analisadas. As frações são consideradas ativas quando CL<sub>50</sub> for menor que 1000 µL/mL. (MEYER et al. 1982). O cálculo para determinar a porcentagem de náuplios mortos está descrito na fórmula descrita a seguir:

$$\% \text{ de mortos} = \frac{\text{teste} - \text{controle}}{\text{controle}} \times 100$$

### 3.9.2 Atividade hemolítica

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo método de Banerjee et al. (2008), adaptado.

Foram transferidos 5 mL de sangue de carneiro de origem comercial, previamente homogeneizado sob leve agitação, para um tubo de ensaio e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm com 3 mL de PBS (fosfato de salina tamponada) gelado. Foram realizadas lavagens sequenciais com PBS descartando sempre o sobrenadante até o sobrenadante encontrar-se incolor. Em seguida, foi realizado uma diluição a 2% com a papa de eritrócito utilizando PBS como diluente.

Para o preparo das amostras foram feitas soluções nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL e adicionados 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Todas as amostras e controles foram realizados em triplicatas.



Para a realização da prova de hemólise foram preparados eppendorfs com hemólise a 100% (controle positivo), PBS (controle negativo), e os testes (amostras + hemácias). Na realização do controle positivo foram pipetados 200 µL de triton 1% diluído em água e 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Enquanto que para o controle negativo foram adicionados 20 µL de metanol mais 180 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Os valores de branco foram obtidos por meio de leitura de microplaca de 96 poços contendo somente 200 µL das amostras, sem adição de hemácias. A leitura foi realizada em UV a 540nm.

Em seguida os eppendorfs foram uniformemente homogeneizados com leve agitação manual. Após este procedimento, foram incubados durante 3 horas em estufa com temperatura controlada a 37°C. Ao término da incubação os eppendorfs foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos.

A leitura da absorbância foi realizada em microplaca de 96 poços, para onde foram pipetados 200 µL do sobrenadante das amostras. A leitura foi realizada em UV a 540nm.

A hemólise foi calculada com base nos valores de absorbância do tubo de hemólise total, cujo valor é considerado 100%. A taxa de hemólise foi calculada através da fórmula descrita a seguir:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{(\text{Abs teste} - \text{Abs PBS} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs triton} - \text{Abs PBS} - \text{Abs branco})} \times 100$$

Os valores foram submetidos ao programa estatístico Assistat 7.7 utilizando o teste de Tukey (p<0,05).

### 3.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.10.1 Redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A medida da atividade sequestrante de radicais livres de DPPH• foi realizada com base na metodologia proposta por Mensor et al. (2001), Nascimento et al. (2011) e Santos (2007). Para análise foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,3 mM). Na execução do ensaio foi utilizada uma microplaca de 96 poços, sendo adicionado em cada poço 142 µL de amostra e 58 µL de DPPH•. Como controle positivo foram utilizadas soluções metanólicas de BHT, rutina e vitamina C,

e esses foram preparados do mesmo modo que as amostras. Foram preparados dois controles, o branco preparado adicionando 142 µL de amostra e 58 µL de metanol, e o negativo preparado com 142 µL de metanol e 58 µL de DPPH•. Todas as amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os testes foram realizados em triplicata. Foi feita a leitura em 540 nm em espectrofotômetro Multiskan FC® com luz ultravioleta. Para a expressão dos resultados foi utilizada a fórmula descrita a seguir:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs negativo}}$$

Foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (CI<sub>50</sub>) em gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo  $y = ax + b$ , serviu de base para determinação do valor de CI<sub>50</sub>.

Os valores foram submetidos ao programa estatístico Assistat 7.7 utilizando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.10.2 Formação do complexo fosfomolibdênio

O ensaio de complexação pelo fosfomolibdênio foi realizado de acordo com Prieto, Pineda e Aguilar (1999). A técnica baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, pela amostra analisada, e obtenção de um complexo fosfomolibdênio V, de coloração verde em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente a 695 nm. O método possui a vantagem de avaliar, de forma simples, a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

Para a reação de formação do complexo foi necessário o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1 mol (28 mL), molibdato de amônio 0,03 mol (12 mL) e ácido sulfúrico 3 mol (20 mL), sendo o volume completado com água destilada para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C, rutina e BHT (butilhidróxidotolueno), bem como as amostras a serem testadas foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol.

Em um tubo de ensaio, foi pipetado uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra, adicionado 1 mL de reativo seguido de 1,5 mL de água destilada. O mesmo foi realizado com os padrões. Para o branco foi utilizado metanol no lugar da amostra. A análise foi realizada em triplicata. Os tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente foi realizada a leitura das absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro de UV Multiskan FC® em 695 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C, rutina e BHT.

As fórmulas descritas a baixo demonstram o cálculo de atividade antioxidante frente a rutina, vitamina C e BHT:

$$\text{AA\% em relação à Rutina} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$\text{AA\% em relação à Vitamina C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$\text{AA\% em relação ao BHT} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (BHT)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

Os valores foram submetidos ao programa estatístico Assistat 7.7 utilizando o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados 5527 gramas de partes aéreas de *P. axillaris*, sendo deste total 1193 gramas de folhas e 4334 gramas de caule, esses valores referem-se ao peso do material seco.

### 4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

O exemplar analisado de *P. axillaris* mede aproximadamente 14 metros de altura, possui caules cilíndricos acastanhados e folhas alternas de face adaxial verde-escura e face abaxial amarela-ferrugínea (FIGURA 7).

FIGURA 7 - PARTES DE *P. axillaris* UTILIZADAS NO ESTUDO MORFOANATÔMICO



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (A) face adaxial e abaxial de *Piptocarpha axillaris*; (B) caules aéreos de *Piptocarpha axillaris* com inflorescências.

#### 4.2.1 Caule

Caule em crescimento secundário, com epiderme e tricomas presentes (FIGURA 8A-D). Células epidérmicas de paredes espessadas (FIGURA 8B), cutinizadas até a base dos tricomas (FIGURA 8C), com compostos fenólicos no citoplasma (FIGURA 8D). Córtex parenquimático e clorofilado na porção subepidérmica, na maior parte rico em esclereides alargadas tangencialmente, entremeadas ao parênquima (FIGURA 8D, 8E); compostos fenólicos abundantes nas camadas subepidérmicas (FIGURA 8D); endoderme presente, com células tangencialmente estiradas, contendo lipídeos (FIGURA 8F). Floema primário na periferia do cilindro vascular, acompanhado de calotas de fibras periféricas (FIGURA 8G), floema secundário rico em esclerênquima (FIGURA 8G); raios floemáticos abertos em leque compostos principalmente de esclereides alongadas tangencialmente, fitomelanina presente nos espaços intercelulares (FIGURA 8G).

A fitomelanina é caracterizada como uma substância que forma uma camada mecanicamente dura, resistente, de coloração marrom a negra, podendo desempenhar a função de proteção contra herbivoria, contra a invasão fúngica e microbiana, prevenindo contra a deterioração e hidratação, e como barreira à luz visível, protegendo o embrião de uma prematura quebra da dormência. (PANDEY et al., 1989; WITTICH; GRAVEN, 1995; PANDEY; DHAKAL, 2001; JEFFREY, 2009). A deposição de fitomelanina também foi descrita no floema da espécie *Piptocarpha oblonga* (LUSA, 2014).

Xilema secundário composto de fibras, raios parenquimáticos largos em vista transversal (com cerca de 4 células de largura), vasos solitários ou em agrupamento radial, parênquima axial paratraqueal (FIGURA 8A, 8H). Parênquima medular esclerificado, com esclereides arredondadas (vista transversal) e fitomelanina nos espaços intercelulares (FIGURA 8I). O xilema secundário composto por fibras também foi evidenciado por Del-Vechio-Vieira et al. (2008) quando estudou a espécie *Ageratum fastigiatum*.

#### 4.2.2 Folha

O pecíolo apresenta superfície recoberta por tricomas tectores ramificados no ápice (FIGURA 9A, 9B), com pedicelo unicelular de paredes cutinizadas; células epidérmicas de formato irregular com paredes espessadas e cutinizadas; compostos fenólicos presentes nas células epidérmicas e nos tricomas (FIGURA 9C), os tricomas tem a função de reduzir a perda de água, defesa contra insetos e barreira a luz. (KELLERMANN; BONA; SOUZA, 2016). Córtex colenquimático na periferia e parenquimático no centro, rico em cristais (drusas), lipídeos (FIGURA 9D) e esclereides esparsas (FIGURA 9E). Três feixes vasculares colaterais centrais com floema abaxial (FIGURA 9A), contendo fibras perivasculares esparsas (FIGURA 9F); compostos fenólicos presentes no parênquima do xilema e floema (FIGURA 9G).

Estudos em folhas de outras espécies da família evidenciaram folhas revestidas por cutícula fina em *Acanthospermum australe* (MARTINS et al. 2006) e folhas hipostomáticas com drusas no pecíolo de *Vernonia condensata*. (LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE, 2003).

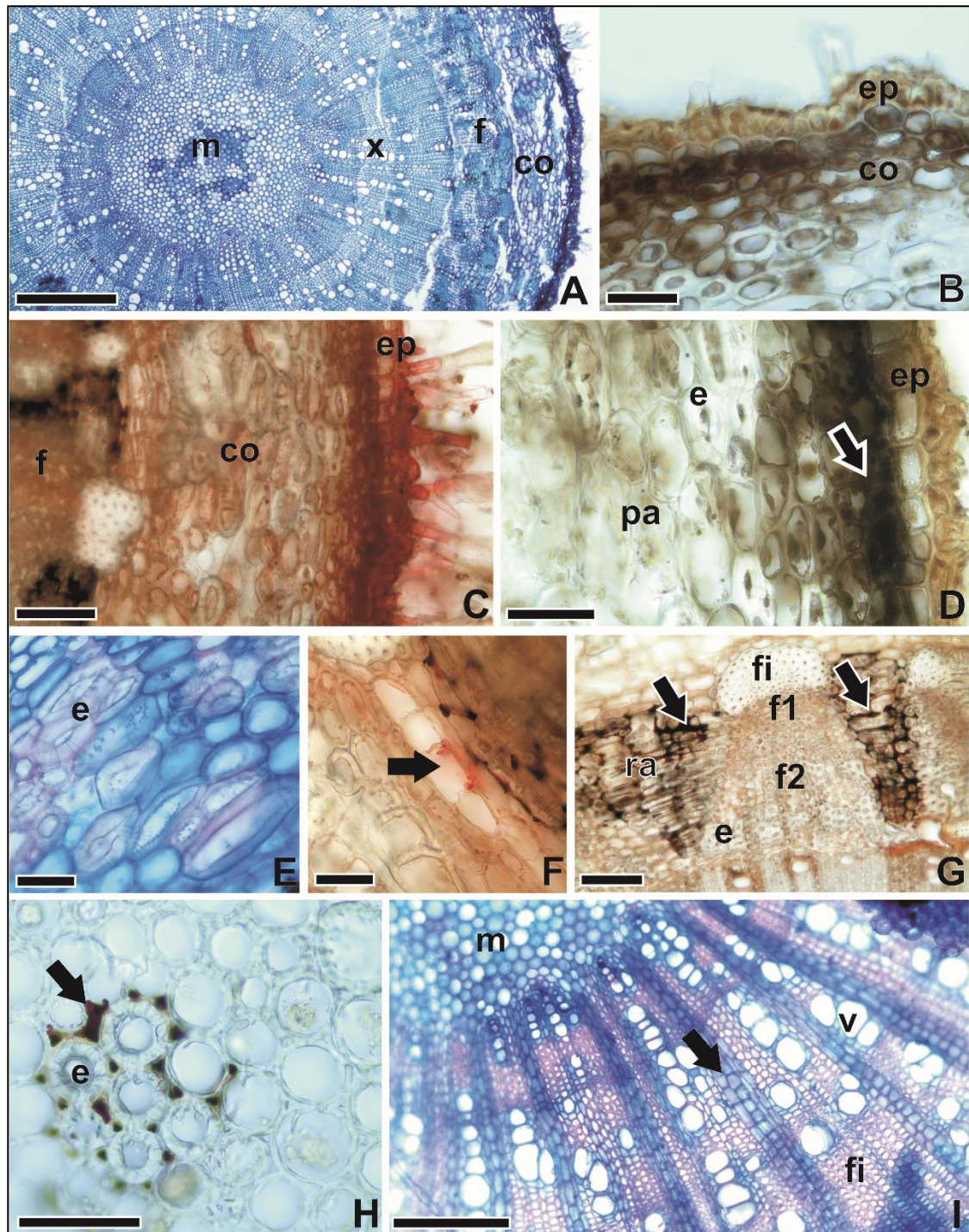
O limbo apresenta-se recoberto densamente por tricomas tectores com uma célula apical ramificada de 4 - 6 pontas (FIGURA 9H – FIGURA 9K) e uma/duas células basais cutinizadas (FIGURA 9I), alguns com pedicelo mais longo se sobrepondo aos demais (FIGURA 9J); tricoma glandular pouco frequente com células basais achatadas e célula apical com lipídeos (FIGURA 9K). Epiderme simples com células maiores e de paredes mais espessadas na face adaxial (FIGURA 9L), cutícula fina (FIGURA 9I). Estômatos somente na face abaxial, encobertos pelos tricomas (FIGURA 9L). Mesofilo dorsiventral com uma a duas camadas de parênquima paliádico seguidas do parênquima esponjoso, ricas em lipídeos (FIGURA 9I, FIGURA 9L) e compostos fenólicos (FIGURA 9L, FIGURA 9M). Nervuras salientes na face abaxial, recobertas por tricomas tectores; feixe vascular colateral com bainha de esclerênquima e extensão de bainha em direção a face adaxial, lipídeos presentes no parênquima, floema e xilema (FIGURA 9N).

Kellermann, Bona e Souza (2016) verificaram que a espécie *Piptocarpha angustifolia* possui tricomas no limbo e pecíolo, sendo que no limbo são tricomas tectores com célula terminal ramificada. Ainda, o limbo apresenta estômatos e mesofilo dorsiventral.

Fonseca, Meira e Casali (2006) ao estudarem a espécie *Porophyllum ruderale* verificaram compostos fenólicos no caule e folhas, e compostos lipídicos nas folhas.

Análises histoquímicas mostram que compostos fenólicos são encontrados principalmente nas células epidérmicas, e terpenoides são encontrados nos tricomas glandulares e nos tecidos parenquimatosos de caules e folhas. (LUSA; COSTA; APPEZATO-DA-GLÓRIA, 2016). Ainda, a presença de compostos fenólicos na epiderme provavelmente está relacionada a proteção do mecanismo celular contra danos da radiação solar. (KOFIDIS; BOSABALIDIS; MOUSTAKAS, 2003; LUSA et al., 2014; SILVA et al., 2014).



FIGURA 8 - SECÇÕES TRANSVERSAIS DO CAULE DE *P. axillaris*

FONTE: O autor (2017).

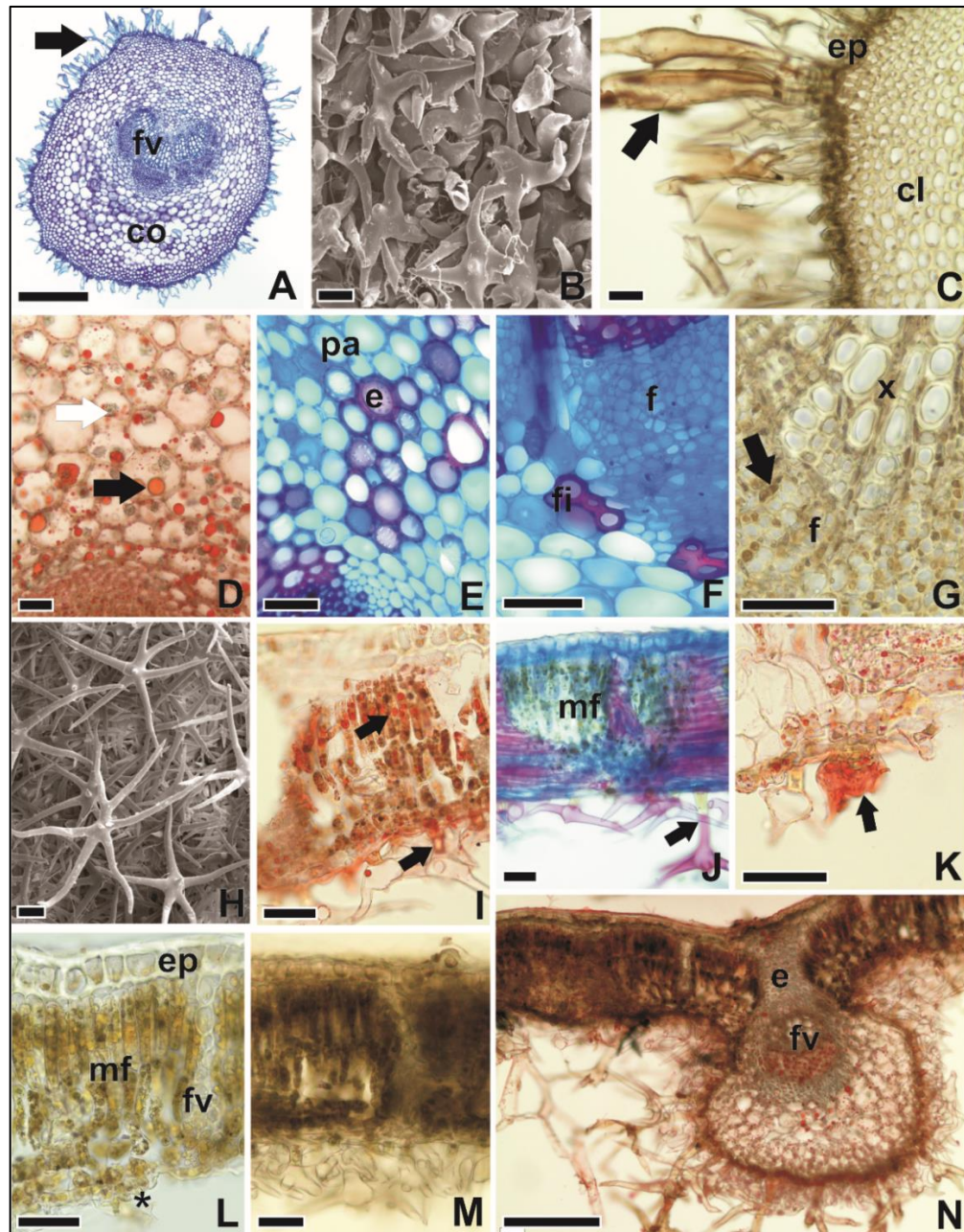
LEGENDA: medula (m), xilema (x), floema (f), floema primário (f1), floema secundário (f2), raio (ra), córtex (co), epiderme (ep), esclereídes ou esclerênquima (e), fibras (fi), vasos (v).

NOTA: A. vista geral. B. epiderme e córtex periférico com compostos fenólicos. C. teste com sudan III, evidenciando epiderme, córtex e floema. D. teste com cloreto férrico evidenciando epiderme e córtex com compostos fenólicos (seta) e esclereídes. E. pormenor das esclereídes corticais. F. pormenor da endoderme com lipídeos (seta). G. região floemática com calota de fibras periféricas e raios compostos de células esclerificadas com fitomelanina intercelular (seta). H. pormenor da medula esclerificada e presença de fitomelanina (seta). I. xilema e medula, raios parenquimáticos (seta), vasos e fibras.

BARRAS: 500  $\mu$ M (A), 50  $\mu$ M (B, D, E, F, H), 100  $\mu$ M (C, G), 200  $\mu$ M (I).



FIGURA 9 - SECÇÕES TRANSVERSAIS E MICROSCOPIA ELETÔNICA DE VARREDURA DE FOLHA DE *P. axillaris*



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: córtex (co), feixes vasculares (fv), colênquima (cl), esclerênquima ou esclereides (e), parênquima (pa), floema (f), mesofilo (mf), epiderme (ep), estômato (\*).

NOTA: A. vista transversal evidenciando tricomas (seta), córtex e feixes vasculares. B. vista frontal evidenciando tricomas tectores (mev). C. teste com cloreto férrico evidenciando composto fenólico nos tricomas (seta) e epiderme. D. E. região cortical do pecíolo. D. reação de sudan III evidenciando gotículas de óleo (seta preta) e drusas (seta branca). E. dupla coloração evidenciando esclereides e parênquima. F. floema com fibras periféricas (fi). G. teste com cloreto férrico evidenciando composto fenólico (seta). H. vista frontal da face abaxial (mev). I. teste com sudan III, evidenciando lipídeos no mesofilo (seta), cutícula e base dos tricomas (seta). J. mesofilo e tricoma com pedicelo longo (seta). K. tricoma secretor (seta), teste com sudan III. L. controle sem coloração. M. teste com cloreto férrico. N. região de nervura principal, reação com sudan III.

BARRAS: 500  $\mu$ M (A), 50  $\mu$ M (B-M), 200  $\mu$ M (N).

### 4.3 PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS

Na (TABELA 1) apresenta os resultados de perda por dessecação e cinzas totais.

TABELA 1 - RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS

AMOSTRA	PERDA POR DESSECAÇÃO (%) $\pm$ DP	CINZAS (%) $\pm$ DP
<b>Caules</b>	9,8213 ( $\pm$ 0,1303)	3,6719 ( $\pm$ 0,3858)
<b>Folhas</b>	8,0123 ( $\pm$ 0,4547)	6,4535 ( $\pm$ 1,0254)

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (DP) desvio padrão.

NOTA: Resultados expressos em média da porcentagem  $\pm$  desvio padrão amostral

O teor de umidade de caules e folhas detectado para a espécie vegetal *P. axillaris* (TABELA 1), encontra-se dentro dos limites (8 a 14%) estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira V (2010). Quando um resultado é inferior ao limite máximo de 14%, pode ser afirmado que houve eficiência durante o processo de secagem do material botânico, pois a presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais pode gerar deterioração dos constituintes, tanto por contaminação microbiana, quanto por hidrólise e atividade enzimática. (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

O resultado da determinação do teor de cinzas totais (TABELA 1) mostrou-se maior para as folhas do que para os caules de *P. axillaris*, por meio desse resultado é possível deduzir que as folhas possuem maior quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis do que os caules. (SIMÕES et al., 2007).

Esses resultados podem contribuir para o estabelecimento de padrões de qualidade e caracterização da espécie vegetal.

#### 4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Os resultados positivos obtidos nos testes estão apresentados na TABELA 2. Além dos testes apresentados na (TABELA 2), também foram realizados com as frações outros testes de estudo fitoquímico preliminar, tais como leucoantocianidinas, alcaloides, antraquinonas e esteroides/triterpenos, porém todos eles apresentaram resultados negativos frente as frações analisadas.

TABELA 2 - RESULTADO DO ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E AQUOSO 20%.

EXTRATO HIDROALCOÓLICO 20 %										
Análises	FH		FC		FAE		FOH		Extrato	
Flavonoides Cumarinas Iridóides	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F
						+ <sup>1</sup>		+ <sup>1</sup>		
			+	+			+	+		
	+	+								
EXTRATO AQUOSO 20 %										
Análises										
Aminogrupos										
Ácidos voláteis										

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (1) flavonas; (C) caule; (F) folha; (+) positivo; (FH) fração hexano; (FC) fração clorofórmio; (FAE) fração acetato de etila; (FOH) fração remanescente.

A identificação com base nos constituintes químicos requer conhecimentos fitoquímicos prévios, por meio de reações químicas de caracterização e/ou perfil cromatográfico. Essas reações possibilitam observar a presença de grupos de substâncias como flavonoides, alcaloides, esteroides, entre outros, sendo ensaios simples, rápidos e acessíveis. Tais reações em geral são inespecíficas, ocorrendo por meio de grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias. (BESSA et al., 2013).

Os metabólitos encontrados condizem com o esquema de separação proposto por Cechinel Filho e Yunes (1998), onde descreve que no extrato hexano pode-se obter esteroides e terpenos, na fração clorofórmio pode haver a presença de alcaloides, cumarina e terpenos e na fração acetato de etila é possível obter flavonoide e taninos.

Em espécies vegetais, os flavonoides estão envolvidos em processos biológicos, por exemplo a proteção dos vegetais contra a incidência dos raios ultravioleta e visível; proteção contra herbivoria, invasão fúngica e microbiana; atração de animais para a polinização; possuem atividades antioxidantes; controlam a ação de hormônios vegetais; são agentes alelopáticos e inibem enzimas. (SIMÕES et al., 2007).

Estudos mostram que as cumarinas possuem atividade antioxidante. (NISHIYAMA; OHNISHI; HASHIGUCHI, 2001; KANEKO; BABA; MATSUO, 2003; ZHANG; WANG, 2004). E assim como os iridoides, as cumarinas também possuem sabor amargo, que atua na defesa da espécie vegetal como desestimulante de herbívoros. (SIMÕES et al., 2007).

Nas plantas são atribuídos aos aminogrupos funções como síntese de proteínas, resistência a alta temperatura e ao ataque de pragas. (CASTRO, 2006).

Referente aos ácidos voláteis, os mesmos estão associados a atividade alelopática da planta, tendo efeito sobre a inibição da germinação e expansão radicular. (CAMARGO et al., 2001).

Os efeitos desses metabólitos nas plantas se assemelha com os descritos na literatura para algumas estruturas evidenciadas no estudo morfoanatômico da espécie *P. axillaris*, tais como, fitomelanina, tricomas e compostos fenólicos (item 4.2) (FONSECA; MEIRA; CASALI, 2006; LUSA, 2014; KELLERMANN; BONA; SOUZA, 2016).

Amorin (2015) em seu estudo com a espécie vegetal *Mikania micranta*, também pertencente à família Asteraceae, identificou compostos semelhantes aos encontrados nesse estudo, como flavonoides (frações acetato de etila e remanescente de caules e folhas), cumarinas (fração remanescente de caules e folhas), iridoides (frações hexano e remanescente de folhas) e aminogrupos (caules e folhas).

No trabalho publicado por Bessa et al. (2013), foi identificado no extrato alcoólico da espécie vegetal *Vernonia brasiliiana* – Asteraceae, alguns compostos diferentes dos identificados nesse estudo como triterpenos, esteroides e sesquiterpenos, porém como apresentado nesse estudo, também foi identificado flavonoides.

Ribeiro, Silva e Castro (2010), realizaram triagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos de caules de três espécies vegetais do gênero *Eremanthus* (*Eremanthus erythropappus*, *Eremanthus glomerulatus* e *Eremanthus incanus*) – Asteraceae, por meio dessa triagem foi possível indicar a presença de açúcares redutores, carboidratos, aminoácidos, taninos, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, carotenoides, esteroides e triterpenos, depsídeos e depsidonas, cumarinas, saponinas, alcaloides, purinas, proteínas, polissacarídeos e antraquinonas.

#### 4.5 PREPARO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

##### 4.5.1 Obtenção do Extrato bruto etanólico e teor de sólidos

Foram obtidos após extração em Soxhlet 5,77 litros de extrato etanólico do caule e 4,022 litros de extrato etanólico das folhas.

Os resultados obtidos no procedimento para obtenção dos valores do teor de sólidos estão descritos na (TABELA 3).

TABELA 3 - ANÁLISE DOS EXTRATOS BRUTOS DE CAULES E FOLHAS

ANÁLISES	CAULES	FOLHAS
<b>Teor de sólidos (%)</b>	0,015 ± 0,0038	0,118 ± 0,00089
<b>Rendimento (%)</b>	0,4327	5,3466

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Rendimento baseado sobre valor em gramas da planta seca.

Diferentes métodos extrativos são empregados para obtenção de extratos vegetais, tais como maceração, infusão, percolação, decocção, Soxhlet, ultrassom e turbólise (GNOATTO et al., 2007; KARABEGOVIĆ et al., 2014, OLIVEIRA et al., 2016). Além dos métodos extrativos, outros fatores influenciam na extração, como a parte do material vegetal utilizada, a origem deste, o grau de processamento, o tamanho da partícula, o solvente utilizado, o tempo de extração, a temperatura, a polaridade e a concentração do solvente. (TIWARI et al., 2011).

#### 4.5.2 Resíduo das frações

Na (TABELA 4) estão descritos os valores de resíduo obtidos nas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente de caules e folhas de *P. axillaris* após o processo de rota evaporação.

TABELA 4 - RESÍDUO DAS FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DA ESPÉCIE *P. axillaris*

AMOSTRAS	MASSA OBTIDA (g)	
	Caule	Folha
Fração hexano	1,22	14,2
Fração clorofórmio	4,13	5,43
Fração acetato de etila	0,92	6,02
Fração remanescente	5,33	30,78

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: (g) gramas.

#### 4.6 DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos têm sua importância no desenvolvimento de espécies vegetais devido a sua função de defesa contra aspectos hostis presentes no meio ambiente. (NIJVELDT et al., 2001).

Os resultados obtidos na determinação dos fenólicos totais, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato/fração estão descritos na (TABELA 5).

TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DOS FENÓIS TOTAIS, EXPRESSOS COMO EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO (EAG) POR G DE EXTRATO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DE *P. axillaris*

AMOSTRA	(mg EAG g <sup>-1</sup> ) ± DP			
	Caule	Tukey	Folha	Tukey
Extrato bruto	11,19 ± 0,09	C	11,48 ± 0,43	C
Fração hexano	3,15 ± 0,33	D	0,54 ± 0,28	E
Fração clorofórmio	4,84 ± 0,43	D	9,58 ± 0,33	C
Fração acetato de etila	40,86 ± 0,38	B	48,34 ± 0,06	A
Fração remanescente	1,91 ± 0,29	DE	2,64 ± 0,38	DE

FONTE: O autor (2017).

NOTA: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. O nível de probabilidade é de 5%.

De acordo com Chew et al. (2011) a quantidade de fenóis totais de espécies vegetais pode ser dividida em quatro classes: alta (superior a 50 mg EAG/g), média

alta (entre 30 e 50 mg EAG/g), média baixa (entre 10 e 30 mg EAG/g) e baixa (inferior a 10 mg.EAG/g). Segundo esta classificação podemos considerar a fração acetato de etila (caule e folha) como média alta, com destaque para a fração acetato de etila (folha) apresentando um resultado superior as demais amostras.

Estudos com espécies vegetais demonstram que os compostos fenólicos em geral são responsáveis pelas atividades antioxidantes presentes nos extratos de plantas, com destaque para o grupo dos flavonoides. (SUN et al., 2011; GHASEMZADEH; OMIDVAR; JAAFAR, 2012).

A fração acetato de etila apresentou maior teor de fenóis totais provavelmente devido ao solvente empregado na extração, pois substâncias fenólicas têm maior afinidade por solventes polares, evidenciada pela presença do ácido clorogênico, já citado. (SPAGOLLA et al. 2009; TIWARI et al., 2011).

Foram encontrados teores significativos de fenóis totais em estudos com plantas pertencentes a família Asteraceae, como por exemplo *Baccharis trimera* (Less.) DC. (SOUSA et al., 2012) e *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore. (OLIVEIRA et al., 2014).

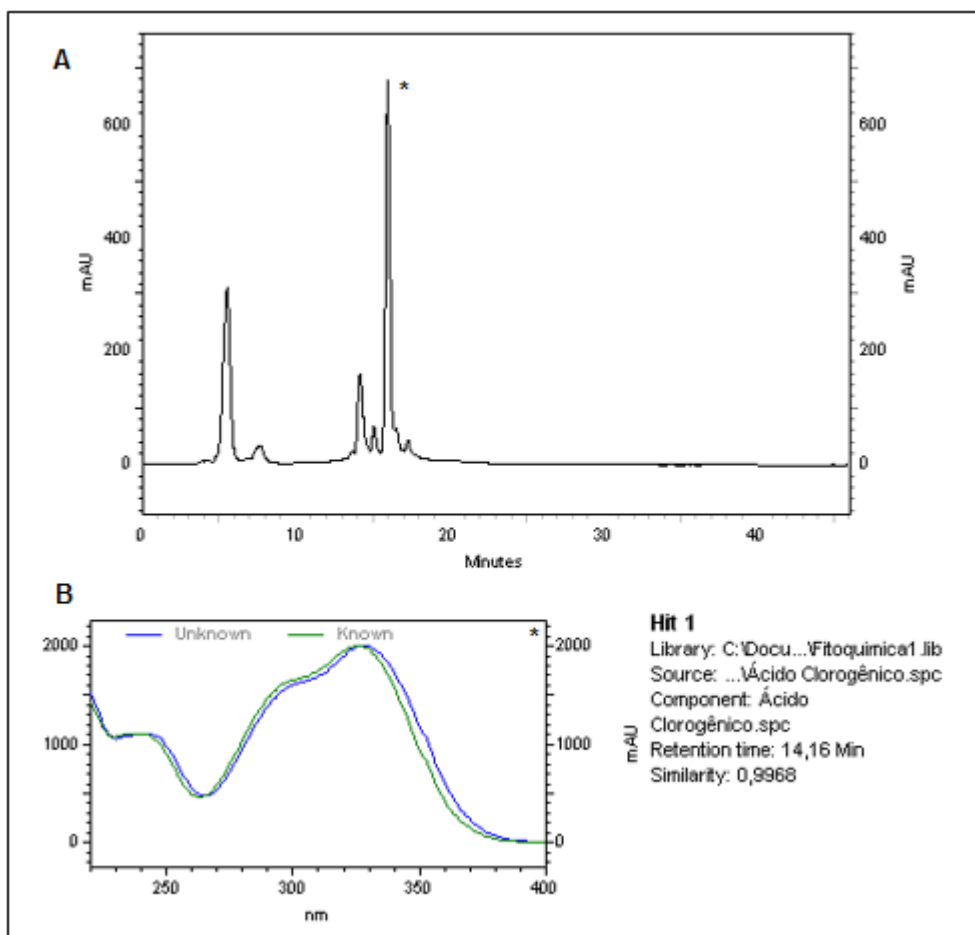
#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DO CONSTITUINTE QUÍMICO

O cromatograma do precipitado da fração acetato de etila (folha) com o respectivo perfil de ultravioleta dos picos majoritários (FIGURA 10), apresenta perfil de ácido clorogênico, comparado com a biblioteca do equipamento utilizado.

O estudo histoquímico apresentado no item 4.2 identificou a presença de compostos fenólicos nas partes aéreas estudadas da espécie vegetal *P. axillaris*. A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido estudada devido as atividades farmacológicas apresentadas por esses compostos. Dentre os grupos de substâncias que constituem os compostos fenólicos estão inseridos os ácidos fenólicos, que se caracterizam por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes é o ácido clorogênico, que é um éster do ácido quínico com o ácido cafeico (FIGURA 11). (SOARES, 2002; GARAMBONE; ROSA, 2007).

FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DO PRECIPITADO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FOLHA) APRESENTANDO EM SEU PICO MAJORITÁRIO PERFIL SEMELHANTE AO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO



FONTE: O autor (2017).

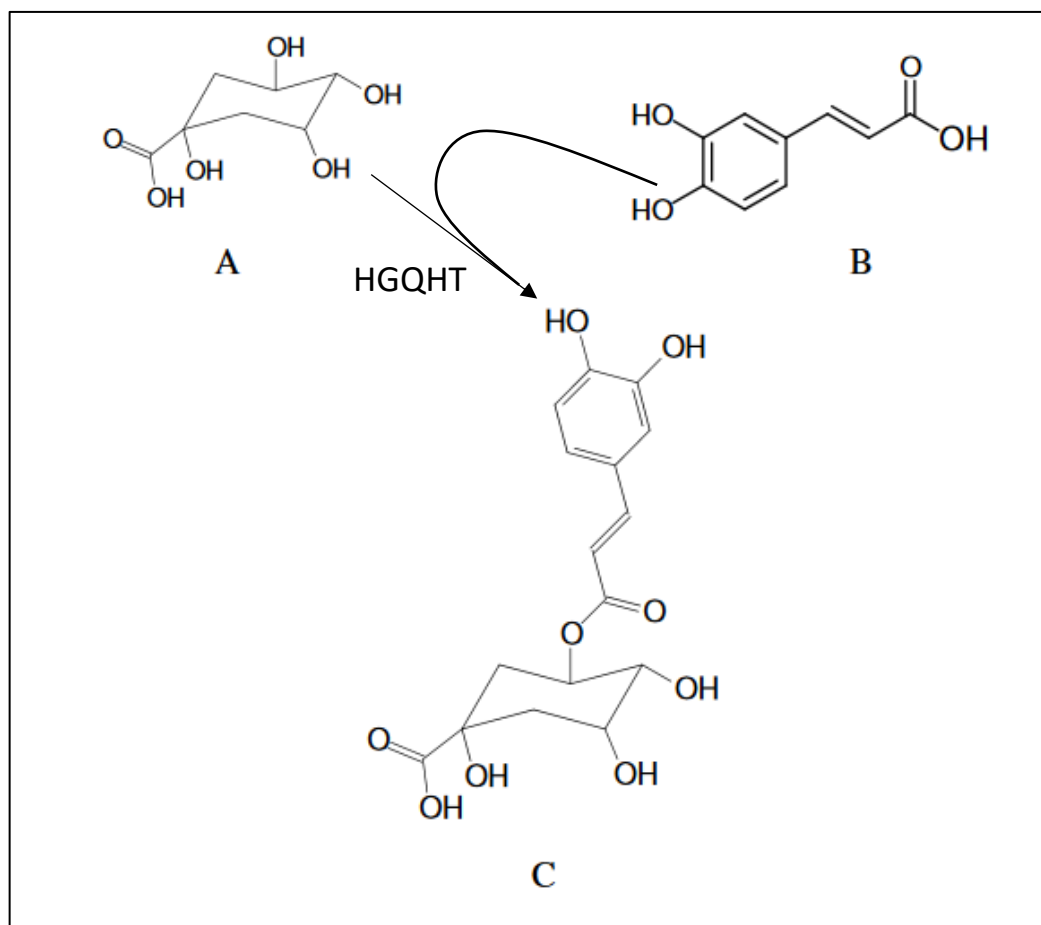
LEGENDA: (A) cromatograma da fração acetato de etila folha, (B) espectro de ultravioleta do pico majoritário em 14,16 min.

Utilizando como método de extração o Soxhlet e os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, Andrade et al. (2012) identificou ácido clorogênico nas frações acetato de etila provenientes de grãos de café já utilizados e cascas de café.

Apresentando elevado potencial antioxidante (SOARES, 2002), em pesquisas realizadas com ácidos fenólicos, o ácido clorogênico demonstrou uma elevada ação inibitória sobre a peroxidação de células como eritrócitos e monócitos. (OHNISHI et al., 1994).



FIGURA 11 - FORMAÇÃO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO A PARTIR DO ÁCIDO QUÍNICO E ÁCIDO CAFEICO.



FONTE: ADOLPHO (2012); TUAN et al. (2014).

LEGENDA: (A) ácido quínico, (B) ácido cafeico, (C) ácido clorogênico, (HGQHT) hidroxicinamoil d-glucose: quinato hidroxicinamoil transferase.

Utilizando o modelo de oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) *in vitro* para verificar o potencial antioxidante de ácidos fenólicos, o ácido clorogênico, apresentou elevado poder antioxidante neste sistema, sendo comparado ao poder antioxidante encontrado para a vitamina E, C e  $\beta$ -caroteno. (LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA, 1994; VINSON et al., 1995; LARANJINHA et al., 1996; VINSON; DABBAGH, 1998).

## 4.8 TOXICIDADE PRELIMINAR *IN VITRO*

### 4.8.1 Avaliação da toxicidade com *Artemia salina* L.

O objetivo do ensaio é avaliar a toxicidade da amostra, sendo considerado um bioensaio preliminar no intuito de verificar a potencial atividade biológica (ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010). É utilizado devido ao fácil manuseio, baixo custo e simples cultivo. A letalidade é avaliada por meio da obtenção da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>), ou seja, a concentração para matar 50% dos microcrustáceos (BEDNARCZUK et al., 2010). Nguta et al. (2011) diferenciou os níveis de toxicidade de acordo os valores de CL<sub>50</sub>, onde amostras com CL<sub>50</sub> inferiores a 100 µg/mL são considerados altamente tóxicas, entre 100 e 500 µg/mL são moderadamente tóxicas, entre 500 e 1000 µg/mL são suavemente tóxicas e acima de 1000 µg/mL são atóxicas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram uma toxicidade maior que 1000 µg/mL, sendo assim, as amostras testadas não apresentam toxicidade preliminar *in vitro* significativa em *Artemia salina* L.

Merino et al. (2015) em seu estudo com a espécie *Senecio westermanii* Dusén (Asteraceae), apresentou um resultado semelhante empregando o mesmo ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo, obtendo uma CL<sub>50</sub> superior a 1000 µg/mL para todas as amostras analisadas.

Arcanjo et al. (2012) relata em seu estudo sobre a bioatividade de extratos etanólicos de diferentes plantas, sendo duas delas pertencentes a família Asteraceae (*Acmella uliginosa* (Sw.) Cass e *Ageratum conyzoides* L.), frente a *Artemia salina* L. Dentre as espécies vegetais analisadas, destaca-se a *A. uliginosa* (CL<sub>50</sub> 18,76 µg/mL – flor; 126,27 µg/mL – folha) por apresentar a maior bioatividade, seguida da espécie *A. conyzoides* (CL<sub>50</sub> 245,72 µg/mL).

### 4.8.2 Atividade hemolítica

A hemólise é caracterizada pelo rompimento do eritrócito, ocorrendo a liberação da hemoglobina. (CARVALHO E. B. et al., 2007). Perante isso na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de amostras oriundas de espécies vegetais,

é necessária a avaliação da atividade hemolítica das plantas. (BEDNARCZUK et al., 2010).

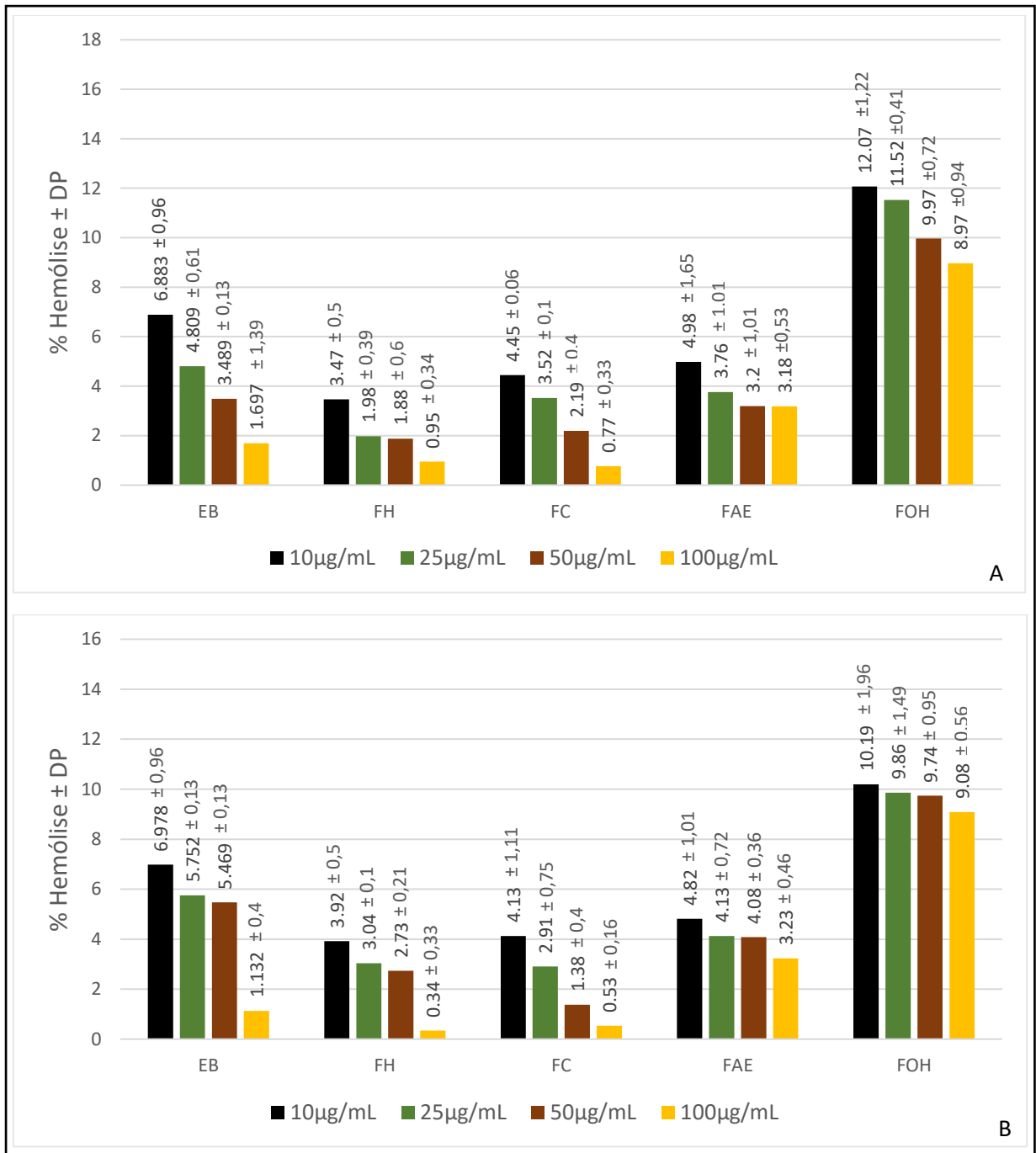
Este ensaio está preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1998 em seu manual, onde informa sobre a necessidade da avaliação qualitativa por meio da observação de coloração vermelha devido a liberação de hemoglobina. (OMS, 1998).

Os resultados do teste de atividade hemolítica estão apresentados na (FIGURA 12) e (TABELA 6).

Das frações analisadas, a que apresentou maior atividade hemolítica foi a fração remanescente, tanto no caule quanto na folha. Ainda, por meio dos resultados apresentados foi possível observar que tanto nas amostras do caule quanto da folha, quanto menor a concentração maior a porcentagem de hemólise. Esse mesmo efeito protetor contra hemólise foi observado nos estudos de Abajo et al. (2004) e Yang et al. (2006), onde foram testados extratos da espécie vegetal *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) frente a hemácias humanas.

Rice-Evans, Miller e Paganga (1996) e Yang et al. (2006) relacionam o efeito protetor contra hemólise com a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Com base nos estudos citados acima atribui-se o efeito protetor contra hemólise apresentado pela espécie vegetal *P. axillaris* nesse trabalho, aos compostos fenólicos descritos no estudo morfoanatômico (item 4.2) e doseamento de fenóis totais (item 4.6), além da atividade antioxidante apresentada pelas frações (item 4.8).

FIGURA 12 - RESULTADO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *P. axillaris*.



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (A) folhas, (B) caules, (EB) extrato bruto, (FH) fração hexano, (FC) fração clorofórmio, (FAE) fração acetato de etila, (FOH) fração remanescente.

TABELA 6 - RESULTADO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DE *P. axillaris*.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	% HEMOLISE FOLHA ± DP	TESTE DE TUKEY*	% HEMOLISE CAULE ± DP	TESTE DE TUKEY**
<b>Extrato bruto</b>	10	6,88 ± 0,96	B	6,98 ± 0,96	B
	25	4,81 ± 0,61	B	5,75 ± 0,13	B
	50	3,5 ± 0,13	B	5,47 ± 0,13	B
	100	1,7 ± 1,39	B	1,13 ± 0,4	B
<b>Fração hexano</b>	10	3,47 ± 0,5	A	3,92 ± 0,5	B
	25	1,98 ± 0,39	B	3,04 ± 0,1	B
	50	1,88 ± 0,6	B	2,73 ± 0,21	B
	100	0,95 ± 0,34	B	0,34 ± 0,33	B
<b>Fração clorofórmio</b>	10	4,45 ± 0,06	B	4,13 ± 1,11	B
	25	3,52 ± 0,1	B	2,91 ± 0,75	B
	50	2,12 ± 0,4	B	1,38 ± 0,4	B
	100	0,77 ± 0,33	B	0,53 ± 0,16	B
<b>Fração acetato de etila</b>	10	4,98 ± 1,65	B	4,82 ± 1,01	B
	25	3,76 ± 1,01	B	4,13 ± 0,72	B
	50	3,2 ± 1,01	B	4,08 ± 0,36	B
	100	3,18 ± 0,53	B	3,23 ± 0,46	B
<b>Fração remanescente</b>	10	12,07 ± 1,22	B	10,19 ± 1,96	B
	25	11,52 ± 0,41	B	9,86 ± 1,49	B
	50	9,97 ± 0,72	B	9,74 ± 0,95	B
	100	8,97 ± 0,94	B	9,08 ± 0,56	B

FONTE: O autor (2017).

LEGENDAS: (\*) folhas; (\*\*) caules; (DP) desvio padrão.

NOTA: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. O nível de probabilidade é de 5%.

Controle positivo (triton 0,1%) = hemólise 100%

## 4.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.9.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Segundo Prieto, Pineda e Aguilar (1999) a vantagem da avaliação antioxidante pelo método fosfomolibdênio é devido a sua capacidade de verificar o potencial antioxidante de componentes hidrofílicos e lipofílicos, permitindo avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos como são os extratos e frações obtidos de espécies vegetais, de maneira simples e de baixo custo.

Os valores de atividade antioxidante das amostras foram calculados em comparação com os padrões rutina, vitamina C e BHT, cujas atividades foram consideradas 100%. Os resultados estão apresentados abaixo na (TABELA 7) e também na (FIGURA 13).

TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE CAULES E FOLHAS DE *P. axillaris*.

AMOSTRAS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA AA (%) ± DP			
	FOLHA	SCOTT-KNOT*	CAULE	SCOTT-KNOT**
EB	49,1 ± 1,35	H	64,45 ± 0,77	E
FH	64,45 ± 1,53	E	89,77 ± 1,53	C
FC	77,45 ± 1,93	D	81,33 ± 1,53	D
FAE	114,58 ± 1,17	B	125,06 ± 0,77	A
FOH	53,2 ± 1,17	G	25,57 ± 0,44	M
	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C AA (%) ± DP			
	FOLHA	SCOTT-KNOT*	CAULE	SCOTT-KNOT**
EB	13,06 ± 0,35	N	17,14 ± 0,2	N
FH	17,14 ± 0,41	N	23,88 ± 0,41	M
FC	20,68 ± 0,51	M	21,63 ± 0,41	M
FAE	30,48 ± 0,31	L	33,26 ± 0,2	J
FOH	14,15 ± 0,31	N	6,8 ± 0,12	O
	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO AO BHT AA (%) ± DP			
	FOLHA	SCOTT-KNOT*	CAULE	SCOTT-KNOT**
EB	32,6 ± 0,88	J	42,78 ± 0,51	I
FH	42,78 ± 1,02	I	59,59 ± 1,02	F
FC	51,61 ± 1,28	G	53,99 ± 1,02	G
FAE	76,06 ± 0,78	D	83,02 ± 0,51	D
FOH	35,31 ± 0,78	J	16,98 ± 0,29	N

FONTE: O autor (2017).

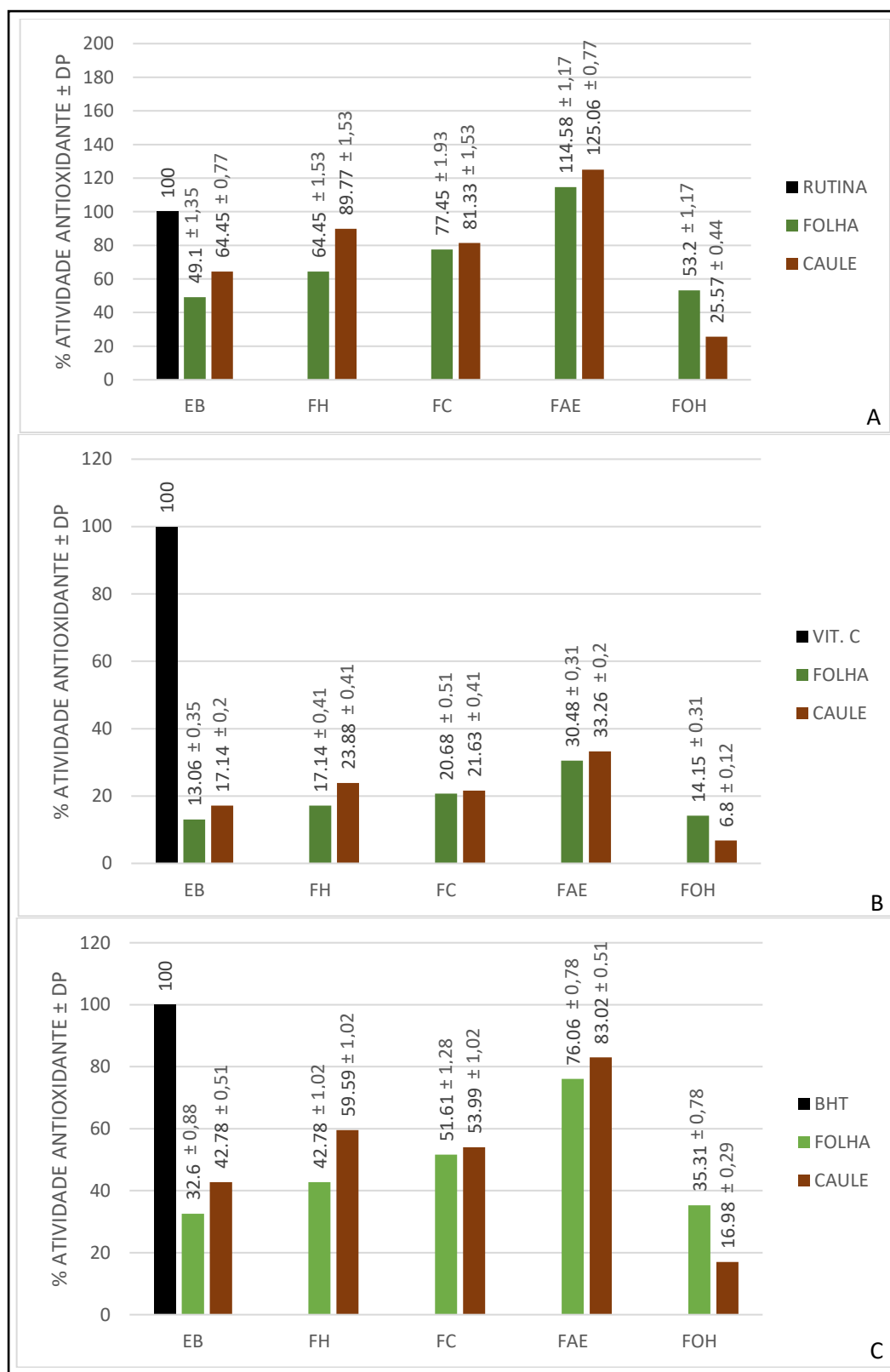
LEGENDA: (DP) desvio padrão, (EB) extrato bruto, (FH) fração hexano; (FC) fração clorofórmio, (FAE) fração acetato de etila, (FOH) fração remanescente, (\*) folhas; (\*\*) caules.

NOTA: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na mesma coluna. O nível de probabilidade é de 5%.

Dentre todas as amostras analisadas a que mostrou um resultado mais promissor perante os diferentes padrões foi a fração acetato de etila que apresentou flavonoide e ácido clorogênico em sua análise fitoquímica preliminar e identificação por CLAE/UV respectivamente, tanto do caule quanto da folha, sendo que frente a rutina seu resultado foi até maior que o do padrão (125,06% - caule; 114,58% - folha), observou-se também que a porcentagem de atividade antioxidante em quase todas as frações foi maior no caule do que na folha.

Outras espécies vegetais da família Asteraceae também apresentaram resultados promissores referente ao seu valor antioxidante através do método fosfomolibdênio, sendo elas o *Senecio westermanii* Dusén (MERINO et al., 2015) e *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. (PAULA et al., 2014).

FIGURA 13 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE *P. axillaris* PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA AOS PADRÕES



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (DP) desvio padrão, (EB) extrato bruto, (FH) fração hexano; (FC) fração clorofórmio, (FAE) fração acetato de etila, (FOH) fração remanescente.

NOTA: (A) rutina, (B) vitamina C, (C) BHT.

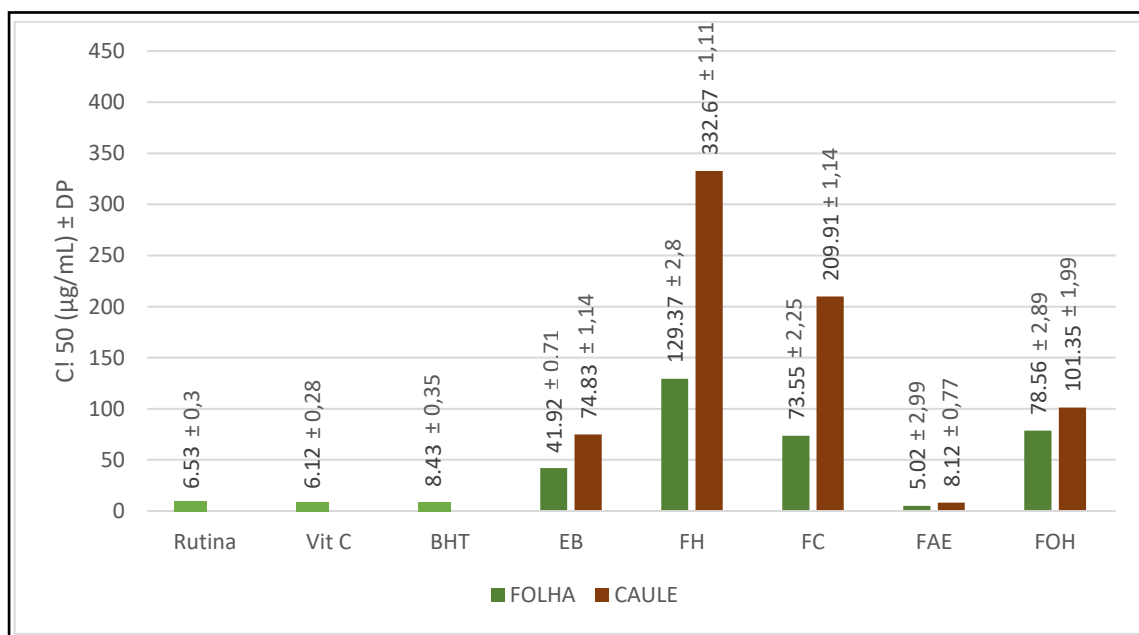
#### 4.9.2 Redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O objetivo desta técnica é detectar a presença de compostos antioxidantes nas amostras analisadas. Baseia-se na eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). É considerada uma técnica fácil, precisa, rápida, simples, e de baixo custo, sendo adequada para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras e/ou mistas. (OLIVEIRA, 2015).

Nesta análise foram calculadas a porcentagem de inibição do DPPH• e por regressão linear foi possível calcular o  $CI_{50}$ , que é a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH•. As amostras foram comparadas com os padrões vitamina C, rutina e BHT.

Os resultados de  $CI_{50}$  estão representados na (FIGURA 14) e (TABELA 8), e correspondem às médias das triplicatas das amostras e o desvio padrão. Os pontos das concentrações utilizadas para cada amostra foram adicionados a linha de tendência e a equação da reta para os padrões e amostras para o cálculo de  $CI_{50}$  (TABELA 9).

FIGURA 14 - RESULTADO DE  $CI_{50}$  DAS AMOSTRA DE *P. axillaris* PARA REDUÇÃO DO DPPH•



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (DP) desvio padrão, (EB) extrato bruto, (FH) fração hexano; (FC) fração clorofórmio, (FAE) fração acetato de etila, (FOH) fração remanescente.



TABELA 8 - RESULTADO DE  $CI_{50}$  DAS AMOSTRA DE *P. axillaris* PARA REDUÇÃO DO DPPH•

AMOSTRA	CI <sub>50</sub> (µg/mL) ± DP			
	Folha	Teste de Tukey*	Caule	Teste de Tukey**
Extrato bruto	41,92 ± 0,71	G	74,83 ± 1,14	F
Fração hexano	129,37 ± 2,8	D	332,67 ± 1,11	A
Fração clorofórmio	73,55 ± 2,25	F	209,91 ± 1,14	B
Fração acetato de etila	5,02 ± 2,99	H	8,12 ± 0,77	H
Fração remanescente	78,56 ± 2,89	E	101,35 ± 1,99	C
	Padrões		Teste de Tukey	
Rutina		6,53 ± 0,3		H
Vitamina C		6,12 ± 0,28		H
BHT		8,43 ± 0,35		H

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: (DP) desvio padrão, (\*) folha, (\*\*) caule

NOTA: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. O nível de probabilidade é de 5%.

TABELA 9 - EQUAÇÃO DA RETA PARA OS PADRÕES E AMOSTRAS PARA O CÁLCULO DE  $CI_{50}$  DE AMOSTRAS DE *P. axillaris* PELO MÉTODO DO DPPH•

AMOSTRA	EQUAÇÃO DA RETA	
	Caule	Folha
Extrato bruto	$y = 0,3387x + 24,655$	$y = 0,6965x + 20,8$
	$R^2 = 0,9915$	$R^2 = 0,9959$
Fração hexano	$y = 0,0991x + 17,032$	$y = 0,1889x + 25,562$
	$R^2 = 0,9914$	$R^2 = 0,9913$
Fração clorofórmio	$y = 0,1423x + 20,13$	$y = 0,3372x + 25,198$
	$R^2 = 0,9919$	$R^2 = 0,9952$
Fração acetato de etila	$y = 6,1473x - 0,8784$	$y = 4,0889x + 29,482$
	$R^2 = 0,992$	$R^2 = 0,9922$
Fração remanescente	$y = 0,3908x + 10,393$	$y = 0,3266x + 24,343$
	$R^2 = 0,9912$	$R^2 = 0,9939$
	Padrões	
Rutina	$y = 5,1951x + 16,078$	
	$R^2 = 0,9987$	
Vitamina C	$y = 5,8221x + 14,379$	
	$R^2 = 0,9963$	
BHT	$y = 4,084x + 15,577$	
	$R^2 = 0,9918$	

FONTE: O autor (2017).

Segundo Chew et al. (2011) a capacidade antioxidante por sequestro de radicais livres pode ser classificada da seguinte maneira: alta ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ), média ( $CI_{50} 50 - 100 \mu\text{g/mL}$ ) e baixa ( $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ).

Sendo assim pode-se considerar que a fração acetato de etila (caule e folha), e o extrato bruto (folha) apresentaram alta capacidade antioxidante, e que a fração hexano (caule e folha), fração clorofórmio (caule) e fração remanescente (caule) apresentaram baixa atividade antioxidante. Ressaltando que a atividade antioxidante da fração acetato de etila (folha) foi superior à dos padrões, provavelmente devido à presença de flavonoide e ácido clorogênico na análise fitoquímica preliminar e identificação por CLAE/UV, respectivamente. Esse resultado referente a alta atividade antioxidante da fração acetato de etila também é descrito por Mensor et al. (2001) em seu estudo.

Outros estudos com espécies vegetais pertencentes a família Asteraceae também apresentaram uma significativa ação antioxidante perante ao ensaio DPPH• na fração acetato de etila, como nas espécies *Senecio westermanii* Dusén (MERINO et al., 2015), *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera (PAULA et al., 2014) e *Baccharis trimera* (Less.) DC (DIAS et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

## 5 CONCLUSÃO

A descrição morfoanatômica da espécie *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker apresentou estruturas já descritas na literatura em espécies vegetais do gênero *Piptocarpha* e também da família Asteraceae.

Em análise fitoquímica preliminar foram evidenciadas substâncias como iridoides, cumarinas, flavonas, aminogrupos e ácidos voláteis, as quais já foram descritas em outros estudos com espécies vegetais da mesma família.

Os resultados dos ensaios de toxicidade preliminar *in vitro* frente a *Artemia salina* L. e hemólise mostraram que a espécie não apresenta toxicidade preliminar.

No que diz respeito a atividade antioxidante, a fração acetato de etila, tanto do caule quanto da folha, foi a que apresentou os melhores resultados frente aos testes de formação do complexo fosfomolibdênio e redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), com resultados melhores que os padrões utilizados. Ressaltando que na fração acetato de etila (folha) houve a caracterização do ácido clorogênico por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, composto esse que apresenta elevada ação antioxidante como já está descrito na literatura.

Sendo assim, este trabalho contribui para o conhecimento da espécie *Piptocarpha axillaris* (Less) Baker, apresentando potencial para estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- ABAJO, C. et al. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 319-323, 2004.
- ADOLPHO, L. O. **Derivados dos ácidos clorogênico, cafeico e cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 145 p. 2012.
- AMORIN, M. **Avaliação morfoanatômica, estudos fitoquímicos e determinação da capacidade antioxidante das folhas e caule de *Mikania micrantha* Kunth. (Asteraceae).** Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2015.
- ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, n. 88, p. 544-552, 2012.
- ANISZEWSKI, T. Alkaloids, Secrets of Life. Amsterdam, **Elsevier**. 334 p. 2007.
- ANTINARELLI, L. M. R. et al. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 8, n. 2, p.733-742, 2015.
- ANVARI, D., JAMEI, R. Evaluation of antioxidant capacity and phenolic content in ethanolic extracts of leaves and flowers of some Asteraceae species. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 9, 2017.
- ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.
- ARCANJO, D. D.R. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.
- BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, n. 2, p. 134-139, 2008.
- BARNES, J. P. et al. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 44, 2010.

BERLYN, G. P., MIKSCHE, J. P. Botanical microtechnique and cytochemistry. **Ames: Iowa State University**, 326p. 1976.

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BIAVATTI, M. W. et al. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.17, n.4, p.640-653, 2007.

BOHM, B. A., STUESSY, T. F. Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Vienna, **Springer**. 831 p. 2001.

BORGES, R. A. X. et al. Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 904p., 2v/il. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. 399 p. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BRITO, C. J. F. A., ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.39, n.4, p.949-951, 1996.

BRUNETON, J., Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 2º ed. Paris. **Lavoisier/Intercept**. 700 p. 1995.

CAMARGO, F. A. O. et al. Aspectos fisiológicos e caracterização da toxidez de ácidos orgânicos voláteis em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 523-529, 2001.

CARVALHO E. B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 2. p. 149-152, 2007.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

CARVALHO, J. L. S. et al. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009.

CASTRO, P.R.C. Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical. Piracicaba: ESALQ, DIBD, **Série Produtor Rural**, v. 32. 46 p., 2006.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEW, Y. L. et al. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G. et al. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 769-776, 2008.

DIAS, L. F.T. et al. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 309-314, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FABRI, R. L. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. In: Construindo a História dos Produtos Naturais. **MultiCiência**. CPQBA/UNICAMP. 2006.

FONSECA, M. C. M., MEIRA, R. M. S. A., CASALI, V. W. D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta daninha**, v. 24, n. 4, p. 707-713, 2006.

GARAMBONE, E., ROSA, G. Possible health benefits of chlorogenic acid. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 2, p. 229-235, 2007.

GHASEMZADEH, A., OMIDVAR, V., JAAFAR, H. Z. E. Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n. 15, p.2971-6, 2012.

GNOATTO, S.C.B. et al. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.- Hil., Aquifoliaceae). **Química Nova**, v.30, n.2, p.304-307, 2007.

GOUVEA, D. R. **Estudo da variação populacional dos metabólitos secundários do arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernoniaceae, Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

GROKOVISKI, L., CERVI, A. C., TARDIVO, R. C. O gênero *Piptocarpha* R. Br. (Asteraceae: Vernonieae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 23 n. 2 p. 486-498, 2009.

GUILARDUCCI, N. V. et al. Efeito da administração oral de extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) no desenvolvimento do Tumor Sólido de Ehrlich. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 23-32, 2016.

HASTON, E. et al. A linear sequence of Angiosperm Phylogeny Group II families. **Taxon**, v. 56, n. 1, p. 7, 2007.

HERZ, W., KULANTHAIVEL, P. Piptocarphol esters from *Piptocarpha opaca*, **Phytochemistry**, v. 22, n. 5, pp 1286 – 1287, 1983.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **New York: McGraw Hill Book**. 523p. 1940.

KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb**, v. 1880, p. 25 – 26, 1880.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, n. 3, p. 239-254, 2003.

KARABEGOVIĆ, I.T. et al. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v.54, p.142-148, 2014.

KELLERMANN, B., BONA, C., SOUZA, L. A., Morfoanatomia da plântula e comparação da folha nas fases juvenis e adulta de *Piptocarpha angustifolia* (Asteraceae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 3, p. 627-638, 2016.

KOFIDIS G., BOSABALIDIS A., MOUSTAKAS M. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). **Annals of Botany** v. 92, p. 635–645, 2003.

LARANJINHA, J.A.N., ALMEIDA, L.M., MADEIRA, V.M.C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon LDL oxidation. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 48, n. 3, p. 487-492, 1994.

LARANJINHA, J.A.N. et al. Inhibition of metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent LDL lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 51, n. 4, p. 395-402, 1996.

LOLIS, M. I. G. A., MILANEZE-GUTIERRE, M.A., Morfo-anatomia das folhas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), o "figatil". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 68-71, 2003.

LUSA, M. G., **Morfoanatomia e fitoquímica de espécies da subtribo *Lychnophorinae* (Asteraceae: Vernonieae) como subsídios para as análises**

**filogenéticas do grupo.** Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia – Campinas, SP, 2014.

LUSA, M. G., COSTA, F. B., APPEZZATO-DA-GLÓRIA B.; Histolocalization of chemotaxonomic markers in *Brazilian Vernoniaeae* (Asteraceae), **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, p. 581–593, 2016.

LUSA, M. G. et al., Functional groups in *Lychnophorinae* (Asteraceae: Vernoniaeae) based on morphological and anatomical traits. **Australian Journal of Botany** v. 62, p. 150–163, 2014.

MARTINS et al., Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 42-52, 2006.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R.L.C., MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**.v.12, n.3, p.380-397, 2010.

MATOS, P. F. de. **Estudo etnobotânico de *Bidens pilosa* (L.) “picão-preto” (Asteraceae) junto à Pastoral da Saúde do município de Criciúma-SC: a fonte do saber e a valorização do conhecimento popular.** Projeto de trabalho de conclusão de curso, apresentado para o curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. Criciúma, 2009.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 1031-1040, 2015.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Biossays for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR.** Curitiba, 2003.

MIGUEL, O. G. **“Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (*Nasturtium officinale*) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento Soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícias e afins”.** PI 06017063-7 A2, 05 Apr. 2006, 11 Dec. 2007.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.



NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327–332, 2011.

NGUTA, J.M. et al. Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 458-78, 2011.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.74, p. 418-25, 2001.

NISHIYAMA, T.; OHNISHI, J.; HASHIGUCHI, Y. Fused Heterocyclic Antioxidants: Antioxidative Activities of Hydrocoumarins in a Homogeneous Solution. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 65, n. 5, p. 1127-1133, 2001.

O'BRIEN, T. P., FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OHNISHI, M. et al. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and hemolysis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 579-583, 1994.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 426 p. 1991.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. et al. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da *Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p. 293-300, 2014.

OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausad de *Dicksonia sellowiana* (presl.) Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, supl. 1, p. 230-239, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Quality control methods for medicinal plants methods. p. 41– 43, 1998.

PAULA, C. S. et al. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 189-195, 2014.

PEREIRA, I. S. P. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica de *Piptocarpha axillaris* (Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

REFLORA in **Flora do Brasil 2020** em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5474>>. Acesso em: 02 Fev. 2018.

RIBEIRO, A. O., SILVA, A. F., CASTRO, A. H. F. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 4, p. 456-465, 2010.

RICE-EVANS, C., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933–956, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 372 p. 1997.  
ROBINSON, H. Generic and Subtribal Classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contributions to Botany**, n. 89, p. 1-116, 1999.

ROBINSON, H. Three new species of *Piptocarpha* (Asteraceae: Vernonieae) from Ecuador and Peru. **Novon**, n. 12, p. 393-398, 2002.

RODRIGUES, M. S. et al., Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes Aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314–317, 2006.

SANTOS, M. H. dos, Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.

SASS, J. E. Botanical microtechnique. 2. ed. **Ames: Iowa State College**, 228 p. 1951.

SCIO, E. et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plant Extracts. In: **RAO V (Ed), Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health**. InTech, 278 p. 2012.

SEAMAN, F.C. et al., Diterpenes of Flowering Plants. Compositae (Asteraceae). **New York, Springer**. 638 p. 1990.

SILVA et al. Mass spectrometry of flavonoid vicenin- 2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. **Scientific Reports** v. 4, p. 1–8, 2014.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany** v. 93, p. 14-18, 2014.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. **Porto Alegre**: 6ª Ed. UFRGS, p. 230 – 237, 2007.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods, **American Journal of enology and viniculture** v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SMITH, G. L. New taxa in *Piptocarpha* R. Br. (Vernonieae: Compositae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 661-667, 1981.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUZA, J. P. et al. *Baccharis rufescens* Spreng. var. *tenuifolia* (DC.) Baker: contribuição ao estudo farmacognóstico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p. 566-574, 2013.

SOUSA, O. V. et al. Teores de fenóis totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). **HU Revista**, v. 38, n. 3 e 4, p. 223-229, 2012.

SPAGOLLA, L. C. et al. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

STEPONKUS, P. L., LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p.1423-26, 1967.

SUN, L. et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. v. 49, n. 10, p. 2689-96, 2011.

SYTAR, O. et al. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Published on the Internet; Disponível em <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 08 Fev. 2018.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: a review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/2707390>>. Acesso em: 01 Fev. 2018.

TUAN, P. A. et al. Enhancement of Chlorogenic Acid Production in Hairy Roots of *Platycodon grandiflorum* by Over-Expression of An *Arabidopsis thaliana* Transcription Factor AtPAP1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 14743-14752, 2014.

VINSON, J. A. et al. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Washington DC, v. 43, p. 2800-2802, 1995.

VINSON, J. A., DABBAGH, Y.A. Tea phenols: antioxidante effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research**, Elmsford, v. 18, n. 6, p. 1067-1075, 1998.

VITTO, L. A. DEL, PETENATTI, E. M. Asteráceas de Importancia Económica y Ambiental. Primera Parte. Sinopsis Morfológica y Taxonómica, Importancia Ecológica y Plantas de Interés Industrial. **Multequina**, n. 18, p. 87-115, 2009.

YANG, H. et al. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.1513-1521, 2006.

YUNES, R. A., CECHINEL-FILHO, V. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental. **Argus**, 523 p., 2001.

ZBIKOWSKA, H. M. et al., Polyphenolic–polysaccharide conjugates from plants of Rosaceae/Asteraceae family as potential radioprotectors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 329–337, 2016.

ZHANG, H.; WANG, L. F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 675, p.199-202, 2004.

## ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

### AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades:** 2000 a 2019.

**Validade da Autorização:** Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior  
Presidente